

**Zur Interaktion von Genotyp und Ernährung bei Darmkrebs:  
Selen- und Selenoprotein P-abhängige Tumorigenese im  
 $Apc^{min/+}$ -Mausmodell**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

**d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

**Dipl. Biol. Thomas Behrends**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen:

1. Prof. Lutz Schomburg
2. Prof. Werner Kloas
3. Prof. Petra Seemann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.November 2012

## Zusammenfassung

Eine chemopräventive Wirkung des Spurenelementes Selen (Se) wird für zahlreiche Krebserkrankungen diskutiert. Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Auswirkungen einer veränderten Selenversorgung über die Nahrung als auch die Rolle des zentralen Transport- und Speicherproteins für Selen (Selenoprotein P, SepP) auf die intestinale Tumorigenese tierexperimentell zu untersuchen.

Ergebnisse aus Studien zu SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) im SepP-Gen zeigen eine Assoziation bestimmter genetischer Varianten mit dem Risiko an Darmkrebs zu erkranken. Als Modellorganismus für eine nachteilige genetische Prädisposition beim Menschen wurden heterozygote SepP<sup>+/-</sup>-Mäuse verwendet und mit der Apc<sup>min/+</sup>-Maus gekreuzt, welche ein etabliertes Modell für Darmkrebs darstellt. Eine weitere Mauslinie (tghSEPP), die leberspezifisch humanes SEPP exprimiert und in den Blutkreislauf sezerniert, wurde eingekreuzt, um zu überprüfen, ob eine verbesserte Versorgung durch zirkulierendes SEPP die Tumorigenese beeinflussen kann.

Den regionalen Unterschieden in der Selenversorgung, wie sie z.B. im Vergleich zwischen Europäern und US-Amerikaner (unterversorgt gegen gut versorgt) festzustellen sind, wurde über die Verwendung unterschiedlicher Fütterungsgruppen Rechnung getragen. Dieser Versuchsansatz versprach somit Erkenntnisse über einerseits die Tragweite einer nachteiligen genetischen Prädisposition in Bezug auf die Tumorigenese und andererseits den potentiell kompensatorischen Einfluss, der präventiv über die nutritive Selenversorgung ausgeübt werden kann.

Eine gestörte SepP-Expression, wie sie in SepP<sup>+/-</sup>-Tieren vorliegt, führte zur Ausbildung größerer Tumore. Durch eine Steigerung der Selenversorgung über die Nahrung konnte sowohl in heterozygoten als auch wildtypischen Tieren eine signifikante Reduktion von Tumoranzahl und Gesamtumorfläche erzielt werden. Hierzu wurde den Tieren ab Tag 21 das Vierfache der empfohlenen Tagesdosis (RDA) für Selen verabreicht. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass die Auswirkungen einer verminderten SepP-Expression in den heterozygoten Mäusen durch eine nutritive Se-Supplementation kompensiert werden können. Die additive Expression des humanen Transgens ergab hingegen keine krebopräventive Wirkung, und resultierte in den supplementierten Versuchsgruppen in einer Aufhebung der beschriebenen positiven Effekte.

Der Verlust eines SepP-Allels war mit einer gesteigerten Infiltration von Mastzellen ins Tumorgewebe und höheren Il6-Spiegeln im Serum assoziiert. Auch waren die Tumore dieser

Versuchsgruppen schlechter differenziert. Die transgenen Tiere wiesen diese Unterschiede nicht auf, zeigten aber gesteigerte Il10-Serumkonzentrationen.

Diese Resultate weisen auf eine modulatorische Wirkung von SepP auf die krebsbedingte Immunantwort hin und unterstreichen eine zentrale Rolle dieses Selenoproteins in Bezug auf anti-kanzerogene Wirkmechanismen von Selen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit erstmals die Abhängigkeit protektiver Selen-vermittelter Effekte von einer optimalen SepP-Expression und die präventiven Fähigkeiten einer gesteigerten Selenzufuhr zur Kompensation eines nachteiligen Genotyps. Somit können gerade Menschen, die aufgrund ihrer genetischen Prädisposition oder einer geographisch bedingten Selenunterversorgung ein erhöhtes Darmkrebsrisiko aufweisen von einer gesteigerten präventiven Supplementation profitieren. Dennoch zeigen Vorarbeiten und die Ergebnisse zu den transgenen Versuchstieren, dass es gerade in Bezug auf eine therapeutische Anwendung unabdingbar ist, ein wachstumsförderndes Potential einer solchen Intervention nach erfolgter Tumorinitiation auszuschließen. Hierzu muss in weitergehenden Studien noch eine geeignete Strategie entwickelt und getestet werden.

## Abstract

A chemopreventive action for the essential trace element selenium is widely discussed for many types of cancer. The aim of this work was to evaluate to which extent the gene expression of the central transport and storage protein for selenium (Selenoprotein P, SepP) is required to mediate health promoting effects and if these effects can be modulated by selenium supplementation.

SNPs (single nucleotide polymorphisms) in the SepP-gene can be associated with a higher risk for colorectal cancer. Molecular mechanisms are unknown so far. Thus SepP<sup>+/-</sup>-mice were crossed with Apc<sup>min/+</sup>-mice to elucidate the potential disadvantage of a decreased SepP-expression. A third mouse strain, expressing human SEPP in liver, was used to study the beneficial effects of additional circulating human SEPP.

The selenium content of European soil is relatively poor compared to areas in for example America. Two diets with different selenium content (0.15 (RDA) versus 0.60 ppm selenium (high Se)) were used to obtain better insights into how SepP-expression influences intestinal tumorigenesis and to which extent negative effects can be compensated for nutritional Se-administration.

The loss of one SepP-allele resulted in the development of larger tumors. Overall tumor-count and -area could be reduced by increasing nutritional selenium concentrations at postnatal day 21 (P21) from 0.15 ppm to 0.6 ppm Se. This effect was significant for both heterozygous and homozygous treatment groups. Increased tumorigenesis, as shown for SepP<sup>+/-</sup>-mice could thus be compensated for raising nutritional Se concentrations. Interestingly, the additional expression of human SEPP did not elicit any cancer-preventive action; it even abolished the described positive effects. Compared to wildtype mice an increased number of mast cells was found in tumorous tissue of SepP<sup>+/-</sup>-mice independent from nutritional Se administration. This was accompanied by a lower differentiation state and higher Il6 concentrations in serum of heterozygous mice. Generally, tumors of transgenic mice were poorly differentiated and the serum-levels for Il10 were elevated.

The results indicate that the SepP genotype is modulating the immune response and highlight the central role of SepP in mediating the anti-cancerogenic effects of Se. We are the first to show that protective effects of Se are related to the expression of SepP and that the negative outcome of a reduced expression can be alleviated by raising nutritional Se supply. Individuals with a higher risk for colorectal cancer caused by Se undersupply or disadvantageous SNPs in genes coding for selenoproteins may thus benefit from

supplementation strategies. Nevertheless the data obtained from transgenic mice and the results of previous studies indicate that therapeutic administration of Se should be handled with care. Especially the potential danger of supplemental Se promoting tumor growth in advanced stages should be addressed in further investigations.

**Schlagwörter:**

Selen, Selenoprotein P, Darmkrebs, Mastzellen

**Keywords:**

selenium, selenoprotein P, colon cancer, mast cells

---

Zusammenfassung .....	2
Abstract .....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	10
1 Einleitung .....	12
1.1 Geschichte des Selens .....	12
1.2 Biologie des Selens .....	14
1.2.1 Biologische Verfügbarkeit .....	14
1.2.2 Selenoproteine .....	17
1.2.3 Eukaryotische Selenoprotein-Biosynthese .....	21
1.2.4 Selenoprotein P .....	23
1.3 Selen und Krebs .....	26
1.4 Ausgewählte Tiermodelle der Krebs- und Selenforschung .....	31
1.4.1 Apc <sup>min/+</sup> -Darmkrebs-Mausmodell .....	31
1.4.2 Selenoprotein P KO-Mauslinie (SepP <sup>-/-</sup> ) .....	32
1.4.3 Leberspezifische hSEPP-transgene Mauslinie (tg <sup>hSEPP</sup> ) .....	33
2 Material und Methoden .....	35
2.1 Materialien .....	35
2.1.1 Chemikalien .....	35
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	35
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	36
2.1.4 Reaktionssysteme (Kits) .....	36
2.1.5 Geräte .....	37
2.1.6 Software und Datenbanken .....	38
2.2 Methoden .....	38
2.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten .....	38
2.2.2 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden .....	41
2.2.3 Histologische Methoden .....	50

2.2.4 Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA) .....	52
2.2.5 Statistische Auswertung .....	54
3 Ergebnisse.....	55
3.1 <i>SepP</i> -Genotyp und Tumorigenese.....	55
3.1.1 Tumorgröße und Verteilung .....	55
3.1.2 Tumor-Grading .....	63
3.1.3 Körpergewicht .....	65
3.1.4 Selenkonzentrationen.....	65
3.1.5 Korrelation von Tumorlast und Serum-Selenspiegel.....	66
3.1.6 Gpx-Aktivität im Serum.....	67
3.1.7 Selenkonzentrationen im Tumorgewebe.....	68
3.1.8 Genchip-Analyse .....	69
3.1.9 Realtime-PCR .....	70
3.1.10 Gewebsmastzellen.....	72
3.1.11 Zytokinkonzentrationen im Serum .....	77
3.2 Einfluss der leberspezifischen <i>hSEPP</i> -Expression auf die Tumorprogression .....	79
3.2.1 Tumorgröße und Verteilung .....	79
3.2.2 Körpergewicht .....	86
3.2.3 Selenkonzentrationen im Serum.....	86
3.2.4 Gpx-Aktivität im Serum ( <i>hSEPP</i> ) .....	89
3.2.5 Selenkonzentrationen im Tumorgewebe von <i>hSEPP/Apc<sup>min</sup></i> -Tieren.....	90
3.2.6 Realtime-PCR .....	92
3.2.7 Mastzellen.....	94
3.2.8 Zytokinkonzentrationen im Serum von <i>hSEPP/Apc<sup>min</sup></i> -Tieren .....	94
4 Diskussion .....	96
4.1 Effekte auf die intestinale Tumorigenese .....	99
4.1.1 Nutritive Selenversorgung und Tumorigenese .....	99

4.1.2 Effekte eines veränderten SepP-abhängigen Se-Metabolismus .....	101
4.2 Genexpression im Tumorgewebe .....	102
4.3 Einfluss auf die krankheitsbedingte Immunantwort .....	105
4.4 Additive Expression des humanen Transgens und Tumorigenese .....	110
4.5 Fazit und Ausblick.....	114
Literaturverzeichnis .....	117
Danksagung .....	134
Publikationsliste.....	136
Eidesstattliche Erklärung .....	138



Meiner Familie gewidmet

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ad lib.</b>	Ad libitum
<b>°C</b>	Grad Celcius
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>APC</b>	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>ATM</b>	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>cDNA</b>	<i>copy DNA</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>COX</b>	Cyclooxygenasen
<b>Ct</b>	<i>Threshold Cycle</i>
<b>Cys</b>	Cystein
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser.
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DIO</b>	Dejodase
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>eEFSec</b>	eukaryotischen Sec-spezifischen Elongationsfaktor
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>ERAD</b>	<i>ER Associated Protein Degradation</i>
<b>FABP</b>	Fettsäure-bindendes Protein
<b>FAP</b>	Familiäre adenomatöse Polyposis
<b>FC</b>	<i>Fold change</i>
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>g</b>	Gramm
<b>GPX</b>	Glutathion-Peroxidase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>IgE</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Liter
<b>LOH</b>	<i>Loss of heterozygosity</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LRP</b>	<i>Low density lipoprotein receptor related protein</i>
<b>MCP1</b>	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
<b>Min</b>	<i>multiple intestinal neoplasia</i>
<b>min</b>	Minute
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinasen
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
<b>MT</b>	Metallothionein
<b>NADP</b>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

<b>NFκB</b>	<i>Nuclear factor κB</i>
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> (offenes Leseraster)
<b>p.a.</b>	pro analysi
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Lösung
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>ppm</b>	<i>parts per million</i>
<b>RDA</b>	<i>Recommended daily allowance</i> (offizielle Empfehlung zur täglichen Aufnahme)
<b>REST</b>	<i>Relative expression software tool</i>
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Sec</b>	Selenocystein
<b>SECIS</b>	Sec-Insertionselment
<b>SeMet</b>	Selenomethionin
<b>SEPP</b>	Selenoprotein P
<b>SERS</b>	Seryl-tRNA-Synthetase
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
<b>SPS2</b>	Selenophosphat Synthase 2
<b>SPSECS</b>	Sec-tRNA <sup>[ser]Sec</sup> -Synthetase
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>TTR</b>	Transthyretin
<b>TXNRD</b>	Thioredoxin Reduktase
<b>Ü.N.</b>	Über Nacht
<b>UTR</b>	Untranslatierter Bereich
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

### Zur Nomenklatur von Proteinen und Genen:

Für alle Gene und Proteine wurden die offiziellen Benennungen oder einer der bei NCBI hinterlegten Alternativnamen verwendet. Die Benennung von murinen und humanen Genen und Proteinen wurde, soweit möglich, regelgerecht in der Schreibweise (Namen von Genen und Transkripten *kursiv*; humane Gene, Transkripte und Proteine in Großbuchstaben) unterschieden. Bei Spezies-unabhängigen Formulierungen wurde die humane Benennung gewählt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte des Selen

Entdeckt wurde Selen im Jahr 1817 von dem schwedischen Forscher Jöns Jakob Berzelius. Auf der Suche nach einem Grund für gehäuft auftretende Vergiftungserscheinungen bei Arbeitern einer Gripsholmer Schwefelsäurefabrik stieß er auf ein ihm bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Element. Anfänglich von ihm und J.G. Gahn für Tellur (lat. tellus „Erde“) gehalten, erkannte er bei genauerer Untersuchung die Einzigartigkeit seiner Entdeckung. Beeinflusst durch diesen Irrtum und die vorhandene Ähnlichkeit zu Tellur (*Tellus* – Göttin der Erde), benannte er es Selen, nach der Mondgöttin aus der griechischen Mythologie (Gilbert, 1818).

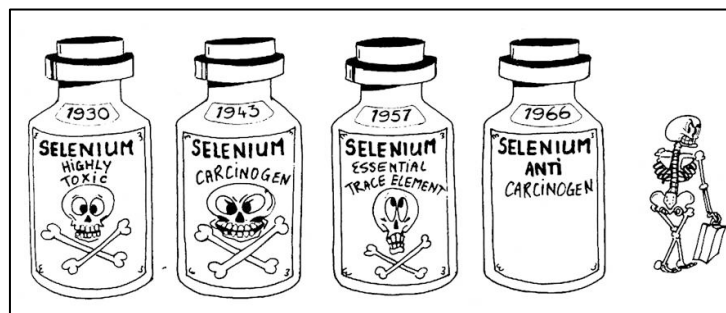
Von seiner Entdeckung bis in die Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts wurde Selen hauptsächlich als gefährliches Toxin angesehen. In den 30er Jahren wurde die sog. „Alkali Krankheit“ in Nutztierbeständen als Selenvergiftung identifiziert (Beath et al., 1934). Es zeigte sich, dass bestimmte Pflanzenarten der Gattung *Astragalus* in der Lage waren, Selen in hohen Konzentrationen zu akkumulieren (Franke, 1934). Von den Tieren gefressen führen sie dann zu den typischen Symptomen einer Selenose wie Abmagerung, Haarausfall und einer Deformation der Hufe. Erstmals wurden diese bereits im Jahr 1295 von Marco Polo in seinen Reiseberichten schriftlich erwähnt, wonach das Gras von Pferden in bestimmten Bergregionen Westchinas zu einem „Abfallen der Hufe“ führen würde (Polo et al., 1933). Dieser Zusammenhang wird aber in der aktuellen Geschichtsforschung bezweifelt (Shao und Zheng, 2008).

Bei der weiteren Untersuchung möglicher Auswirkungen auf die allgemeine Gesundheit wurde ein karzinogener Effekt für Selen angenommen (Nelson et al., 1943). Ratten, die über einen Zeitraum von 18 Monaten auf einer hoch konzentrierten Selendiät (5-10 ppm) gehalten wurden, zeigten eine vermehrte Bildung hepatischer Adenome. Eine entscheidende Kehrtwende in der Selenforschung gelang dem Forscherteam um Schwartz und Foltz im Jahr 1957 (Schwarz und Foltz, 1957). Sie identifizierten Selen als einen Hauptbestandteil einer „Faktor 3“ genannten Komponente. In Vorarbeiten zeigten sie bereits den protektiven Effekt dieser Komponente gegenüber auftretender Lebernekrose in Ratten (Schwarz, 1951). Erstmals wurde Selen somit als essentieller Nahrungsbestandteil angesehen und nicht mehr als reines Toxin. In nachfolgenden Studien konnten auch einige, bis zu diesem Zeitpunkt nicht behandelbare, Erkrankungen (enzootische Myopathien) in verschiedenen

Nutztierbeständen auf eine Selendefizienz zurückgeführt werden, und entsprechende Konzepte zur Vorbeugung oder Therapie wurden erarbeitet (Andrews et al., 1968, Oldfield, 1987, Patterson et al., 1957). Trotz dieser Entwicklungen wurden die Auswirkungen einer Unterversorgung beim Menschen aufgrund der vorherrschenden „Selenophobie“ lange Zeit überaus skeptisch gesehen (Frost, 1972).

In der Region Keshan der nordchinesischen Provinz Heilongjiang wurde 1935 von einer Krankheit berichtet, die hauptsächlich durch Übelkeit und Erbrechen charakterisiert ist. Auch wurden Todesfälle berichtet (Yang et al., 1984). Die klinischen Parameter dieser Erkrankung umfassen weitergehend eine zusätzliche akute oder chronische Herzinsuffizienz und eine damit einhergehende Herzvergrößerung, Arrhythmie bis hin zum kardiogenen Schock. Der genaue Auslöser dieser Erkrankung ist, auch aufgrund mangelnder Tiermodelle, noch unklar. Eine unzureichende Selenversorgung als einer von mehreren Auslösefaktoren wurde bereits im Jahr 1964 angenommen (Xie et al., 1964). Eine weitere endemische Erkrankung, die mit dem Selenstatus in Verbindung gebracht wird, ist die Kashin-Beck-Krankheit, die auch geographisch mit dem Ausbreitungsgebiet der Keshan-Krankheit überlappt (Diplock, 1987, Moreno-Reyes et al., 1998). Hierbei kommt es zur Ausbildung symmetrischer Deformierungen der Arm- und Beingelenke durch ein gehemmtes Skelettwachstum.

Zeitgleich zur beschriebenen Änderung im Ansehen Selens vom Toxin zum essentiellen Spurenelement häuften sich auch erstmals Vermutungen über einen indirekten Zusammenhang von Krebsmortalität und dem Grad der Selenversorgung in den USA (Shamberger und Frost, 1969). Jedoch werden diese Erkenntnisse bis zum heutigen Zeitpunkt kontrovers diskutiert.



**Abbildung 1: Bedeutungswandel des Selens.** Anfänglich als Toxin und Karzinogen beschrieben, erlangte Selen in den letzten Jahrzehnten den Status des essentiellen Spurenelementes und wird in der Krebsprävention diskutiert (Vernie, 1984).

Durch die wachsenden Erkenntnisse über den essentiellen Charakter des Selen wuchs der Wunsch nach Klarheit über die biologische Rolle im Organismus. Schon im Jahr 1957 wurde erstmals die Glutathion-Peroxidase (GPX) beschrieben. Neben ihrer Lokalisation in Erythrozyten, zeigte sie einen protektiven Effekt gegenüber oxidativer Schädigung durch Wasserstoffperoxid (Mills, 1957). Im Jahr 1973 wurde Selen dann als integraler Bestandteil der GPX nachgewiesen (Rotruck et al., 1973) und es wurde erstmals als Selenoenzym erwähnt (Flohe et al., 1973). Mittlerweile ist die Anzahl der bekannten Selenoprotein-kodierenden Gene im humanen Genom auf 25 angewachsen (Kryukov et al., 2003). Als Selenoproteine werden Proteine angesehen, die die 21te proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec) in ihrer Primärstruktur enthalten. Durch intensive Forschungsarbeit zählen derzeit die Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD) (Tamura und Stadtman, 1996), die Dejodasen (DIO) (Arthur et al., 1990, Behne et al., 1990, Berry et al., 1991), die Glutathion-Peroxidasen (GPX) (Ursini et al., 1995) und auch Selenoprotein P (Akesson et al., 1994) zu den bekanntesten Vertretern der Selenoproteine. Letzteres zeichnet sich insbesondere durch eine hohe Anzahl von Sec in seiner Primärstruktur aus, welche es für seine hauptsächliche Funktion als Transport- und Speicherprotein im Blutkreislauf prädestinieren (Burk et al., 2003, Schomburg et al., 2003). Neben diesen etablierten Vertretern unter den Selenoproteinen gibt es noch eine Reihe weitgehend unerforschter Mitglieder, die bislang nur durch Genom-Screenings beschrieben wurden und deren Funktion bisher unverstanden ist (Kryukov et al., 2003).

## **1.2 Biologie des Selen**

### **1.2.1 Biologische Verfügbarkeit**

Die Anreicherung von Selen aus dem Boden erfolgt über die Nahrungskette. Die Aufnahme aus dem Boden geschieht hierbei über Pflanzen oder Mikroorganismen hauptsächlich in Form von anorganischem Selen. Nicht nur der allgemeine Se-Gehalt der Böden oder pflanzenspezifische Charakteristika, sondern auch der pH-Wert bestimmt den Grad der Akkumulation in den Pflanzen. Durch das Zusammenspiel dieser Parameter gelten sowohl Europa als auch der Osten und Norden Asiens als Selenmangelgebiete (Combs, 2001, Rayman, 2000) (Tabelle. 1). Die Hauptquelle für den täglichen Selenbedarf stellen, je nach geographischer Region und damit Selengehalt der pflanzlichen Agrarprodukte, verschiedene

Getreideformen oder Fleisch, Fisch und die sekundären Produkte der Nutztierzucht, wie Erzeugnisse aus der Milchproduktion oder Eier, dar. Bezogen auf das Frischgewicht gilt dies auch für Obst und Gemüse (Combs, 2001). Die empfohlenen humanen Tagesdosen (55 µg für Frauen; 70 µg für Männer) sind Richtwerte und wurden auf Grundlage der benötigten Aufnahme für eine maximalen Expression der im Blut zirkulierenden extrazellulären GPX3 ermittelt.

Um lokalen Defizite in der Selenversorgung auszugleichen, gehen einige Länder dazu über, mit Selen angereicherte Düngemittel im Ackerbau zu verwenden und somit den Selengehalt flächendeckend oder in ausgewählten Nahrungsmitteln kontrolliert zu steigern (Kopsell und Randle, 1999, Makela et al., 1993, Reilly, 1998). Hier ist in erster Linie Finnland zu erwähnen, das seit 1984 ein entsprechendes Supplementationsprogramm durchführt.

**Tabelle 1: Verteilung der Prävalenz für einen niedrigen Selen-Status auf Grundlage von Literaturwerten gemessener Blut-Selen-Konzentrationen (Combs, 2001).**

Prävalenz-Kategorie	Land		
<b>Hoch (&gt;50%)</b>	China Deutschland Griechenland Kuba Österreich Sambia Tschechien	Bulgarien Chile Jamaika Spanien Ungarn Usbekistan	Estland Neuseeland Niger Nigeria Nordirland Polen Slowakische Republik
<b>Mittelgradig (10-50%)</b>	Australien England Frankreich Indien Italien Taiwan	Belgien Bolivien Dänemark Türkei Venezuela	Mexico Portugal Russland Schweden Schweiz
<b>Niedrig (&lt;10%)</b>	Burundi Finnland Irland Kanada	Ägypten Japan USA	Korea Norwegen Schottland

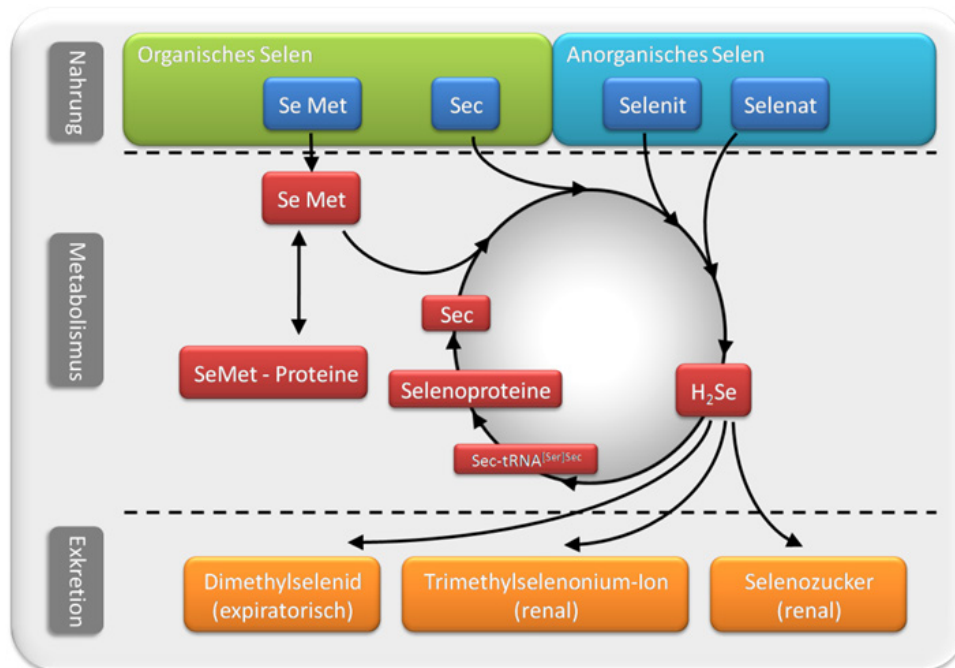
Je nach Art der Nahrung wird Selen in seinen verschiedenen Formen hauptsächlich in den distalen Segmenten des Dünndarms resorbiert. Diese Formen sind sowohl organischer als auch anorganischer Natur. Zu ihnen gehört das über Pflanzen, tierische Quellen bzw. Nahrungsergänzungsmittel (Selenhefen) aufgenommene Selenomethionin (SeMet), das hauptsächlich von tierischen Quellen stammende Selenocystein (Sec), sowie das anorganische Natriumselenit oder -selenat (Rayman, 2000). Die GesamtabSORPTION von Selen im Darm ist generell sehr gut und liegt bei ungefähr 80-90%. Die einzelnen Se-Formen unterscheiden sich aber durchaus in ihrer Absorptionsrate. Für SeMet liegt diese bei über

90%, wohingegen Selenit eine Absorption über den gesamten Gastrointestinaltrakt von nur ungefähr 60% aufweist (Stewart et al., 1978). Gründe hierfür könnten unter anderem in den verschiedenen Transportmechanismen liegen. So soll SeMet über einen Transportmechanismus (wie Methionin) aktiv aufgenommen werden, wohingegen für die anorganischen Formen ein Transport durch passive Resorption beschrieben wurde (Whanger et al., 1976). Bei den anorganischen Formen wird eine Abhängigkeit der Resorption vom Vorhandensein weiterer Ernährungskomponenten, u.a. Vitamin C, angenommen (Robinson, 1989).

In Bezug auf die biologische Verfügbarkeit von Selen spielt aber nicht nur die Aufnahme, sondern auch die „Organifizierung“ der einzelnen Verbindungen im Organismus eine wichtige Rolle. Die biologische Halbwertszeit von Selen im Körper wird auf ca. 100 Tage geschätzt (Griffiths et al., 1976). Zwar liegt die Halbwertszeit für SeMet höher, jedoch ist es durch den unspezifischen Einbau in alle Methionin-haltigen Proteine des Körpers in weitaus geringerem Maße als funktionelles Selen (in Form von biologisch aktiven Selenoproteinen) verfügbar (Thomson, 1998). Wenn auch nicht enzymatisch funktionell, so scheint die Inkorporation von SeMet in die Primärstruktur von Proteinen, vor allem in Muskel- bzw. Nierengewebe und Erythrozyten, als zusätzlicher „Langzeit“-Selenspeicher zu dienen (Rea et al., 1979, Whanger et al., 1993). Sec wird zu Dihydrogenselenid reduziert und steht dann direkt für die Biosynthese von Selenophosphat und Selenocystein und schließlich Selenoproteinen zur Verfügung (Abb. 2).

Die Ausscheidung von überschüssigem Selen erfolgt renal, intestinal oder über die Lunge. Bei der respiratorischen Exhalation gelangt es als Dimethylselenid in die Umwelt, welches auch die Ursache für den auftretenden „knoblauchartigen“ Mundgeruch im Verlauf einer Selenvergiftung ist (McConnell und Roth, 1966).





**Abbildung 2: Schematische Abbildung zur Aufnahme, Metabolisierung und Exkretion verschiedener Selenformen.** Im Gegensatz zum ungerichteten Einbau von Selenomethionin, gelangt Sec direkt in den metabolischen Selenid-Pool. Die Exkretion erfolgt hauptsächlich über den Urin.

### 1.2.2 Selenoproteine

Selenoproteine sind sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich verbreitet und haben unterschiedliche Funktionen. Abgrenzen muss man hier die Selenomethionin- und Selenhaltigen Proteine von den „echten“ Selenoproteinen. Die Primärstruktur letzterer beinhaltet Selen in Form der 21ten proteinogenen Aminosäure Sec. Viele der heute bekannten Sec-haltigen Proteine konnten durch diesen Umstand, allein aufgrund computergestützter Sequenzanalysen, identifiziert werden (Gladyshev et al., 2004, Hatfield und Gladyshev, 2002). Das mannigfaltigste Selenoproteom ist bei Fischen vorzufinden (30 Selenoproteine), gefolgt vom Menschen (25 Selenoproteine) und den Nagetieren (24 Selenoproteine) (Castellano et al., 2005). Verschiedene evolutionäre Einflüsse scheinen zu einer mosaikartigen Verteilung der Selenoproteine in den einzelnen Organismen, bis hin zum kompletten Verlust in einigen Insektenarten (*D. willistoni*, *B. mori* und *T. castaneum*), Pilzen, Hefen oder höheren Pflanzen (*A. thaliana*, *O. sativa*) geführt zu haben (Lobanov et al., 2007, Lobanov et al., 2009). Mit Ausnahme der Wirbeltiere hat somit weitgehend eine Reduktion des Selenoproteoms beim Übergang zum Landleben stattgefunden, wobei die Ursache hierfür noch nicht geklärt ist (Lobanov et al., 2007).

### 1.2.2.1 Selen-haltige Proteine

Erstmals entdeckt wurden die Selen-haltigen Proteine in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durch die Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  in Ratten (Banerjee und Sani, 1982) und später in Mäusen (Bansal et al., 1989). Mittels Aufreinigung und Gewinnung entsprechender Antikörper gelang die Identifikation von zwei leberspezifischen Selen-haltigen Proteinen (SELENBP1/2; L-FABP), denen jedoch ein Sec-codierendes TGA-Kodon im Leseraster der DNA-Sequenz fehlte und deren zelluläre Regulation unabhängig von der diätetischen Selenaufnahme ist (Bansal et al., 1990).

Die Rolle dieser Proteine in Bezug auf den Selenstoffwechsel ist noch unbekannt. SELENBP1 spielt eine Rolle in der Regulation von Zellwachstum (Bansal et al., 1990, Giometti et al., 2000), bei Alterungsprozessen (Cho et al., 2003), im Lipidstoffwechsel (Park et al., 2004) und bei Transportprozessen innerhalb des Golgi-Apparates (Porat et al., 2000). Bei der Suche nach Biomarkern und potentiellen Risikogenen für Schizophrenie wurde eine starke Hochregulation von SELENBP1 im Gehirn und Blut von Patienten festgestellt (Glatt et al., 2005). Beide Proteine sind in verschiedensten Krebserkrankungen, wie Haut- bzw. Brust- (Lanfer et al., 1993), Ovarial- (Stammer et al., 2008), Schilddrüsen- (Brown et al., 2006), Prostata- (Yang und Sytkowski, 1998) und Darmkrebs (Kim et al., 2006) anders als bei gesunden Menschen exprimiert.

L-FABP ist ein zytosolisches Protein aus der Familie der Fettsäure-bindenden Proteine (FABPs) und beteiligt an der Diffusion, Bindung sowie dem Transport langkettiger Fettsäuren (Storch und Thumser, 2000). Ein entscheidender Anteil der FABPs im Fettsäuremetabolismus von Herz, Leber und Skelettmuskel konnte bereits im Mausmodell nachgewiesen werden (Binas und Erol, 2007).

### 1.2.2.2 Selenomethionin-haltige Proteine

SeMet wird als pflanzlicher Nahrungsbestandteil aufgenommen und während der Proteinbiosynthese anstelle von Met unspezifisch eingebaut. Dieser alternative Einbau erfolgt vorwiegend bei erhöhter Aufnahme von SeMet über die Nahrung, gleichzeitig verringerter Methionin-Verfügbarkeit und einem niedrigen intrazellulären Schwefel/Selen-Verhältnis (Behne und Kyriakopoulos, 2001). Über die biologischen Wirkungen dieser SeMet-haltigen Proteine ist wenig bekannt. Da der Einbau nicht an determinierten Positionen stattfindet und es durch Transselenierung in den Sec-Zyklus überführt werden kann (Abb. 2),

scheint SeMet dennoch der Se-Speicherung zu dienen. Diese erfolgt vorwiegend in Muskel, Niere und Erythrozyten (Whanger et al., 1993). Neuere Erkenntnisse zur biologischen Bedeutung dieser Proteine zeigen eine mögliche Verbindung zu Prozessen, die an der Initiation von Krebserkrankungen beteiligt sind (Papp et al., 2007).

### 1.2.2.3 Sec-haltige Selenoproteine

Viele der Sec-haltigen Selenoproteine sind Enzyme, die Redox-Reaktionen katalysieren und bei denen sich die Aminosäure Sec im aktiven Zentrum befindet. Vergleicht man Selen und Schwefel, ergeben sich große Ähnlichkeiten in chemischen und physikalischen Eigenschaften beider Elemente. Ihre Atomradien bei ionischen und kovalenten Bindungen unterscheiden sich nur wenig, was auch für Bindungsenergien, Ionisationspotential, Elektronegativität und Polarisierbarkeit gilt (Tab.2). Der Vergleich der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein (Cys) mit ihrem Selenhomolog Sec liefert jedoch entscheidende Unterschiede. Der pKa-Wert für Sec ( $pK_a = 5,5$ ) ist deutlich geringer im Vergleich zu Cys ( $pK_a = 8,3$ ) und daraus ergibt sich für Sec ein weitaus höheres Redoxpotential (Tab.2) (Huber und Criddle, 1967).

**Tabelle 2: Vergleich physikalischer und biochemischer Eigenschaften von Selen und Schwefel, sowie der Aminosäuren Selenocystein (Sec) und Cystein (Cys)** (Johansson et al., 2005).

	Atommasse	Oxidationstufen	Elektronegativität	Atomradius (Å)
<b>Selen</b>	78,96	-2, 0, +4, +6	2,4	1,17
<b>Schwefel</b>	32,07	-2, 0, +4, +6	2,5	1,04
	Struktur	pK <sub>A</sub>	Redoxpotential	Kodon
<b>Sec</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\    \\  \text{H}_2\text{C} \\    \\  \text{SeH}  \end{array}  $	5,2	-488mV (2x Sec vs. Sec; pH 7,0)	UGA
<b>Cys</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{OH} \\    \\  \text{H}_2\text{C} \\    \\  \text{SH}  \end{array}  $	8,3	-233mV (2xCys vs. Cys; pH 7,0)	UGU, UGC

Bei einem physiologischen pH-Wert sind die Selenolgruppen von Sec dissoziiert, wohingegen die Thiolgruppen von Cystein vorwiegend protoniert vorliegen. Daraus ergibt sich ein starker Einfluss auf die katalytische Funktion der entsprechenden Proteine (Ursini und Bindoli, 1987). Experimente mit rekombinanten Sec→Cys-Mutanten einzelner Selenoenzyme, wie z.B. bei den Glutathion-Peroxidasen (Maiorino et al., 1998, Rocher et al.,

1992), Iodthyronin-Dejodasen (Berry et al., 1991, Larsen et al., 2000) oder Thioredoxin-Reduktasen (Holmgren und Zhong, 2000, Stadtman et al., 2001) ergaben eine 10 - 1000fach verringerte enzymatische Aktivität der Cys-Varianten. Der gezielte genetische *knock-out* der Selenocysteinyl-tRNA und das damit einhergehende Versagen der Selenoprotein-Biosynthese, ist im Mausmodell embryonal letal. Dies belegt eindrucksvoll den essentiellen Charakter einiger Vertreter dieser kleinen Proteinfamilie bei Säugetieren (Bosl et al., 1997). Das vielfältige Funktionsspektrum der Selenoenzyme reicht von ihrer Aufgabe in der zellulären Abwehr gegenüber endogenem und exogenem oxidativen Stress (GPX, TXNRD) über die zentrale Rolle in der Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen (DIO) bis hin zur Beteiligung an der Proteinfaltung (Selenoprotein 15, Selenoprotein N, Selenoprotein M) und dem Abbau falschgefalteter Proteine (Selenoprotein S) im Endoplasmatischen Retikulum. Für einige Selenoproteine ist eine genaue Funktion noch nicht bekannt, es werden jedoch auch antioxidative Eigenschaften vermutet (Gromer et al., 2005). Eine Übersicht der humanen Selenoproteine mit Angaben über Funktion und Lokalisation (soweit bekannt) zeigt Tabelle 3.

**Tabelle 3: Das humane Selenoproteom.** Aufgeführt sind alle derzeit bekannten Selenoproteine mit beschriebenen Funktionen, Sec Lokalisation im Protein, Expressionsmustern und ihrer subzellulären Lokalisation (zyt = zytosolisch; sek = sekretiert; ma = membranassoziiert; nuk = nukleär; mi = mitochondrial; pn = perinukleär) (Gromer et al., 2005, Kryukov et al., 2003, Reeves und Hoffmann, 2009).

Selenoprotein	Funktion	Sec Lokalisation im Protein (Proteinlänge)	Expression (Subzelluläre Lokalisation)
<b>Glutathion-Peroxidasen (GPX)</b>			
GPX1 (cGPX)	antioxidativ	47 (201)	ubiquitär (zyt)
GPX2 (giGPX)	antioxidativ	40 (190)	epithelial (zyt)
GPX3 (pGPX)	antioxidativ	73 (226)	Niere, Schilddrüse (sek)
GPX4 (PHGPX)	antioxidativ, Strukturprotein in Spermien	73 (197)	ubiquitär, besonders Gehirn, Testes (zyt, ma, mi, nuk)
GPX6	unbekannt	73 (221)	unbekannt
<b>Thioredoxin-Reduktasen (TXNRD)</b>			
TXNRD1	antioxidativ	498 (499)	ubiquitär (zyt, nuk)
TXNRD2	antioxidativ	655 (656)	Leber, Niere, Herz (mi)
TXNRD3	antioxidativ	522 (523)	Testes (zyt)
<b>Iodthyronin-Dejodasen (DIO)</b>			
DIO1 (D1,IOD1)	Konvertierung von Iodthyroninen und	126 (249)	Schilddrüse, Leber, Niere, Hypophyse (ma)

Selenoprotein	Funktion	Sec Lokalisation im Protein (Proteinlänge)	Expression (Subzelluläre Lokalisation)
<b>DIO2 (D2,IOD2)</b>	Thyronaminen Konvertierung von Iodthyroninen und Thyronaminen	133 (265)	Schilddrüse, Gehirn, Herz, Muskulatur, Darm (ER-ma)
<b>DIO3 (D2,IOD3)</b>	Konvertierung von Iodthyroninen und Thyronaminen	144 (278)	Gehirn, Plazenta, Muskulatur (ma)
<b>Selenophosphat Synthetase 2 (SPS2, SEPHS2)</b>	katalysiert Selenophosphat-Synthese	60 (448)	ubiquitär (zyt)
<b>Selenoprotein 15 kDa (SEL15)</b>	Thiodisulfid-Isomerase Aktivität	93 (162)	unbekannt (ER)
<b>Selenoprotein H (SELH)</b>	nicht bekannt	44 (221)	unbekannt (zyt)
<b>Selenoprotein I (SELI)</b>	nicht bekannt	387 (397)	unbekannt (zyt)
<b>Selenoprotein K (SELK)</b>	nicht bekannt	92 (94)	unbekannt (ma)
<b>Selenoprotein M (SELM)</b>	Thiodisulfid-Isomerase Aktivität	48 (145)	unbekannt (pn)
<b>Selenoprotein N (SELN)</b>	nicht bekannt	428 (556)	ubiquitär (zyt)
<b>Selenoprotein O (SELO)</b>	nicht bekannt	667 (669)	unbekannt (zyt)
<b>Selenoprotein P (SEPP, SEPP1, SELP)</b>	Transport und Speicherung von Selen	59,300,318,330,345,352,367, 369, 376, 378 (381)	ubiquitär (sek)
<b>Selenoprotein S (SELS, VIMP, Tanis)</b>	beteiligt an der Retrotranslokation (ERAD)	188 (189)	unbekannt (ER)
<b>Selenoprotein T (SELT)</b>	Calcium Homöostase		unbekannt (ER)
<b>Selenoprotein V (SELV)</b>	unbekannt	273 (346)	unbekannt (zyt)
<b>Selenoprotein W (SELW)</b>	unbekannt	13 (87)	Muskulatur, Herz (zyt)
<b>Selenoprotein X (SELX,SELR)</b>	Methionin Sulfoxid Reduktase	95 (116)	Pankreas, Leber, Niere, Leukozyten (zyt)

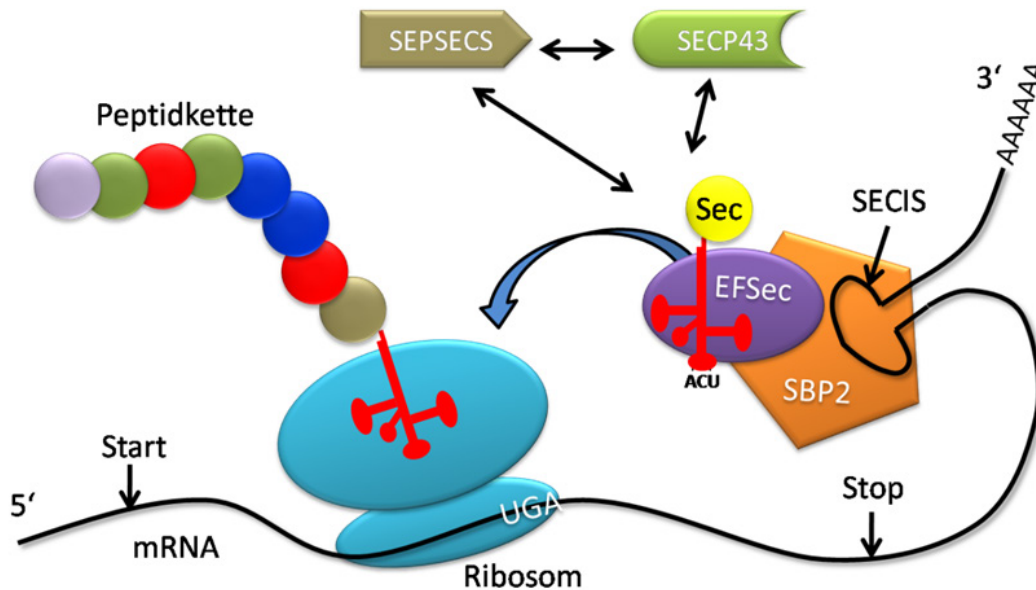
### 1.2.3 Eukaryotische Selenoprotein-Biosynthese

Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Sec zu den Aminosäuren Serin und Cystein war eine der ersten Hypothesen zum zugrundeliegenden Mechanismus der Biosynthese von Sec-enthaltenden Selenoproteinen ein post-translatiionaler Austausch der Hydroxyl- bzw. Sulfhydryl-Gruppe gegen eine Selenolgruppe (Burk und Hill, 1993). Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung des eigentlichen, co-translationalen Einbaus von Sec lieferten die Erkenntnisse über eine erweiterte Interpretation des UGA-Stopp-Kodons (Bock et al., 1991, Zinoni et al., 1987).

Mit Hilfe dieser Arbeiten gelang der Nachweis eines tRNA-Moleküls mit entsprechender Anti-Kodon-Sequenz (Leinfelder et al., 1988). Im Gegensatz zu anderen Aminosäuren erfolgt die Synthese von Sec direkt auf der tRNA. Hierzu wird die unbeladene tRNA<sup>[ser]Sec</sup> durch die Seryl-tRNA-Synthetase (SERS) mit Serin zur Seryl-tRNA<sup>[ser]Sec</sup> beladen. Dieser Komplex wird durch die Phosphoseryl-tRNA-Kinase (PSTK) phosphoryliert. Die Phosphoseryl-tRNA wird dann unter Verwendung von Selenophosphat (SeP) durch die Sec-tRNA<sup>[ser]Sec</sup>-Synthase

(SEPSECS) zur Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> umgesetzt. SeP wird unter ATP-Verbrauch durch die Selenophosphat Synthetase 2 (SPS2), welche ihrerseits wiederum ein Selenoprotein darstellt, bereitgestellt (Xu et al., 2007). Die Beteiligung eines Selenoproteins (SPS2) auf dieser frühen Ebene des Biosynthese-Mechanismus könnte hierbei einen autoregulatorischen Schritt in der Selenoprotein-Biosynthese darstellen (Guimaraes et al., 1996). Um einen Translationsstopp bei der Rekodierung des UGA-Kodons zu verhindern und den Einbau von Sec über die Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> zu gewährleisten, bedarf es mehrerer trans-Elemente (Berry, 2005). Bei Eukaryoten befindet sich im 3'-untranslatierten Bereich (3' UTR) hinter dem offenen Leseraster (ORF) eine Haarnadelstruktur, die unter den einzelnen Selenoproteinen in ihrer Sequenz variiert. Die Position dieser Sec-Insertionselmente (SECIS-Elemente) ist ebenfalls variabel und kann bis zu mehreren Kilobasen (kB) entfernt vom UGA-Kodon lokalisiert sein (Berry et al., 1991, Berry et al., 1993).

Während der Translation bindet das SECIS-bindende Protein 2 (SBP2) an das SECIS-Element und bildet ein Komplex mit dem eukaryotischen Sec-spezifischen Elongationsfaktor (eEFSec) und der Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> (Papp et al., 2007). Das ribosomale Protein L30 interagiert durch eine Konformationsänderung mit dem SECIS-Element und bewirkt die tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Freisetzung und den Sec-Einbau in die Polypeptidkette (Chavatte et al., 2005). Für das 43-kDa RNA-bindende Protein (SECp43) wird eine Rolle in der Regulierung der unterschiedlichen Sec-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>-Isoformen angenommen (Xu et al., 2005).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biosynthese von Selenoproteinen.** Zum cotranslationalen Einbau von Sec werden sowohl cis- (SECIS-Element, UGA-Kodon) als auch trans-(SBP2,EFSec) Elemente benötigt. Das SECIS-Element im 3'-untranslatierten Bereich wird durch SBP2 und EFSec erkannt und gebunden. Hierdurch wird die beladene tRNA zum Ribosom dirigiert und steht für den Einbau zur Verfügung. Weitere Faktoren sind an der Bereitstellung der beladenen tRNA (SEPSECS,SECP43) beteiligt.

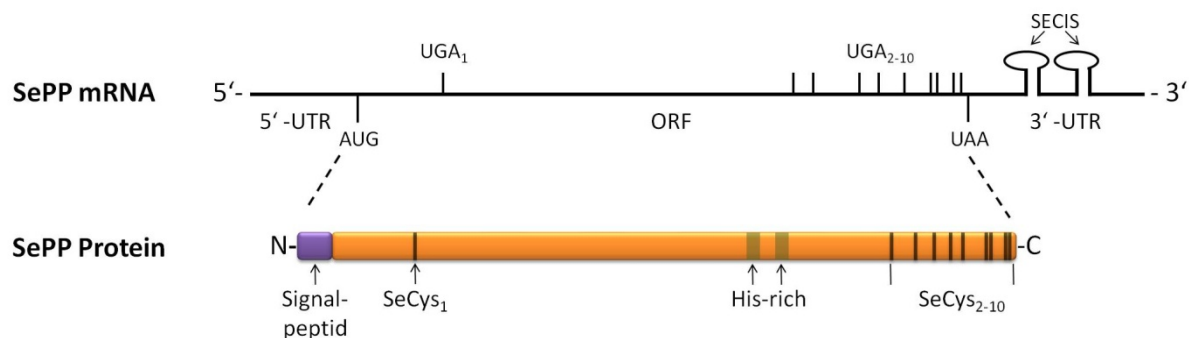
#### 1.2.4 Selenoprotein P

In der Familie der Selenoproteine hat Selenoprotein P (SEPP) aufgrund seiner einzigartigen Eigenschaften eine Sonderstellung. Erstmalig entdeckt wurde es durch Markierungsstudien mit  $^{75}\text{Se}$  im Serum von Ratten (Herrman, 1977). Da es vorwiegend im Plasma nachgewiesen werden konnte, erhielt es den Namen Selenoprotein P (P für Plasma).

Schon früh wurde eine Beteiligung am Selentransport vermutet (Motsenbocker und Tappel, 1982). Es weist als einziges Selenoprotein zwei SECIS-Elemente auf (Castellano et al., 2005), was vermuten lässt, dass diese Eigenschaft für den mehrfachen Einbau von Sec-Resten in die Primärstruktur benötigt wird. Tatsächlich enthält humanes SEPP bis zu 10 und das homologe Protein in Zebrafisch sogar 17 Sec-Reste (Burk und Hill, 2009, Kryukov et al., 2003).

Im Plasma von Ratten konnten 4 Isoformen identifiziert werden, die sich in ihrer Länge unterscheiden. Im Gegensatz zu „full-length“ SEPP werden die restlichen Isoformen vermutlich durch einen alternativen Translationsstopp an der zweiten, dritten oder siebten Sec-Position gebildet. Das Vorhandensein mehrerer Isoformen bei Mäusen (Hill et al., 2007) und Menschen (Akesson et al., 1994) wird vermutet, ist aber noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen (Burk und Hill, 2005). Grundsätzlich kann für SEPP eine Aufteilung in zwei

Domänen vorgenommen werden, die auf der Verteilung der Sec-Reste beruht (Saito und Takahashi, 2002). Die größere N-terminale Domäne enthält einen einzelnen Sec-Rest, zwei Histidin-reiche Abschnitte und reicht bis unmittelbar an den zweiten Sec-Rest. Die verbleibenden Sec-Reste befinden sich in der kürzeren C-terminalen Domäne (Burk und Hill, 2005) (Abb. 4). Da sich in der N-terminalen Domäne ein vermutlich redoxaktives UxxC-Motiv (AS 59-62) befindet, wurde versucht, eine enzymatische Aktivität von SEPP nachzuweisen (Yang et al., 1987). Aus humanem Serum aufgereinigtes SEPP zeigte in einer späteren Studie die Eigenschaft, katalytisch als Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPX) zu wirken (Takahashi et al., 1999). Zusätzlich bindet es pH-abhängig an Heparin (Akesson und Martensson, 1991) und kann somit auch mit Zellmembranen interagieren (Burk et al., 1997, Wilson und Tappel, 1993).

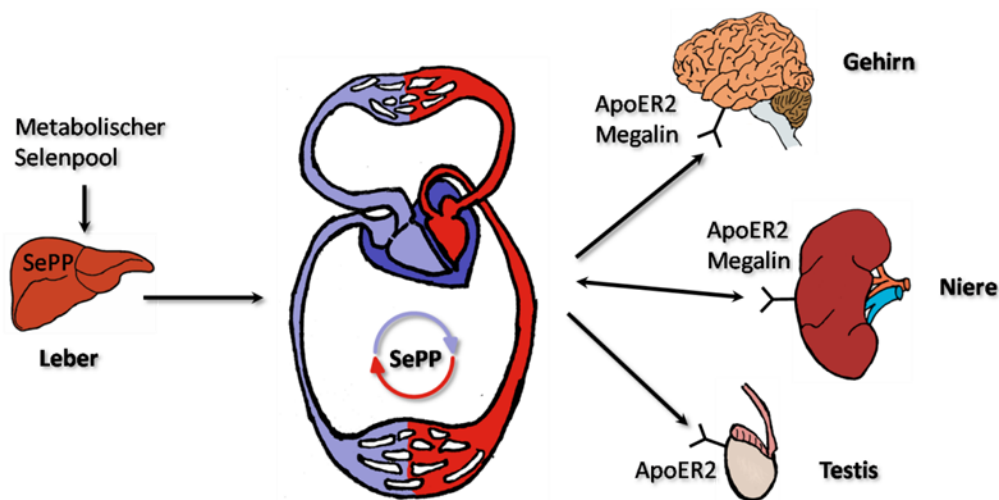


**Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen mRNA und Proteinstruktur von Selenoprotein P.** Im Gegensatz zu den restlichen Selenoproteinen besitzt SePP zwei Selenocystein Insertions-Elemente (SECIS) und bis zu 10 Sec-kodierende UGA-Kodons. Von den bis zu zehn Sec in der Primärstruktur von SePP ist nur das N-terminale an einer potentiellen enzymatischen Funktion beteiligt.

Die Synthese von SEPP findet hauptsächlich im hepatischen Gewebe statt, welches der Ursprung für ca. 75% des plasmatischen SEPPs ist (Carlson et al., 2004). Je nach Selenstatus stellt SePP einen unterschiedlich großen Anteil des plasmatischen Selenpools (Combs et al., 2011). SePP ist neben der GPX3 das einzige aktiv ins Plasma sezernierte Selenoprotein (Akesson et al., 1994). Die entscheidenden Erkenntnisse zur zentralen Rolle als Transport- und Speicherprotein lieferten murine *knock-out* Modelle. Die Deletion des *SepP*-Gens resultierte in einer drastischen Abnahme der Selenkonzentrationen in Gehirn und Testes, bei unveränderter bzw. geringfügig erhöhten Konzentrationen in der Leber und einer leichten Abnahme in der Niere und anderen Geweben (Hill et al., 2003, Schomburg et al., 2003). Zusätzliche Untersuchungen zeigten ebenso eine gesteigerte Ausscheidung von



aufgenommenem Selen über den Urin bei SepP-knockout Mäusen (Burk et al., 2006). Die Auswirkungen einer unzureichenden Selenversorgung, insbesondere für das Gehirn und die männlichen Gonaden, spiegeln sich auch im Phänotyp der SepP<sup>-/-</sup>-Maus wieder. Die Haltung der Tiere auf Selen-defizienter Nahrung führt zu neurologischen Störungen, die durch epileptische Anfälle, Störungen im Bewegungsablauf sowie progressive Ataxie der hinteren Extremitäten in Erscheinung treten. Diese phänotypischen Merkmale beruhen auf einer unzureichenden zerebralen SepP-Expression (Hill et al., 2004, Schweizer et al., 2005). Männliche SepP<sup>-/-</sup>-Mäuse sind infertil, wobei auch eine erhöhte Selensupplementation diese Symptomatik nicht aufheben kann. Durch die Selenunterversorgung der Gonaden kommt es im Verlauf der Spermatogenese zu Defekten im Bereich des Mittelstücks heranreifender Spermien, in dem ein weiteres Selenoprotein (Gpx4) als struktureller Bestandteil dient (Olson et al., 2005). Eine gewebespezifische Expression von humanem SEPP in der Leber von SepP<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte in einer weiterführenden Studie eine Korrektur der Infertilität und des neurologischen Phänotyps (Renko et al., 2008).



**Abbildung 5: Die Rolle von Selenoprotein P in der Selenhomöostase.** Versorgt durch den metabolischen Selen-Pool synthetisiert vorwiegend die Leber Selenoprotein P. Von dort aus gelangt es über den Blutkreislauf zum Zielgewebe. Gewebespezifisch erfolgt die Expression der SEPP-Rezeptoren ApoER2 und Megalin. Das Gehirn bedient sich eines gewebespezifischen SePP-Kreislaufs um seine prioritäre Selenversorgung auch in Zeiten limitierter Selenversorgung aufrecht zu erhalten.

Neuere Studien zeigen eine rezeptorvermittelte Aufnahme von SepP in die Zielgewebe durch zwei Mitglieder der Lipoproteinrezeptorfamilie. In den Testes bindet SepP an Apolipoprotein-E-Rezeptor-2 (ApoER2), welcher in der Zellmembran von Sertolli-Zellen lokalisiert ist. Die

Deletion des *ApoER2*-Gens führt entsprechend auch zur Infertilität (Olson et al., 2007). Sowohl für ApoER2 als auch für Megalin wird eine bedeutende Aufgabe im Selenstoffwechsel der Niere, bei der Reabsorption gefilterter SepP-Proteine oder -Fragmente (Olson et al., 2008) und im Gehirn bei der Aufrechterhaltung eines prioritären Selenstatus (Burk et al., 2007, Chiu-Ugalde et al., 2010) postuliert.

Durch die ausführliche Charakterisierung der vorhandenen SepP<sup>-/-</sup>-Mausmodelle konnten mögliche klinische Parameter zur Identifizierung von Personen mit einem Defekt im *SepP*-Gen eingegrenzt werden (Schweizer et al., 2011). Patienten mit biologisch inaktivem SEPP wurden bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beschrieben. Die Untersuchung von Polymorphismen im Promotorbereich des humanen Genabschnitts ergab eine starke Auswirkung auf den allgemeinen Selenspiegel, bedingt durch veränderte Expressionsraten und unabhängig von der Selenaufnahme (Al-Taie et al., 2002, Meplan et al., 2007). *Missense*-Mutationen des an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligten SBP2 gehen einher mit einem gestörten Schilddrüsenhormon-Metabolismus und signifikant niedrigeren SEPP-Konzentrationen im Serum der untersuchten Patienten (Dumitrescu et al., 2005). Vergleicht man die bisherigen Erkenntnisse aus Tierexperimenten mit dem beschriebenen Wissensstand über humane Defekte, so könnte der starke Phänotyp der SepP<sup>-/-</sup>-Maus ein Indiz für einen letalen Charakter solch einer Mutation beim Menschen sein.

### 1.3 Selen und Krebs

Schon unmittelbar nachdem der Wandel in der Sichtweise von Selen hin zum essentiellen Spurenelement vollzogen wurde, ließen erste Studien eine anti-kanzerogene Wirkung vermuten (Shamberger und Frost, 1969). Zahlreiche Studien mit teils widersprüchlichen Ergebnissen folgten zur genaueren Untersuchung eines chemopräventiven Effektes bei verschiedenen Krebserkrankungen. Der Großteil dieser Arbeiten belegt zwar einen anti-kanzerogenen Charakter, jedoch sind die Ansätze zur Beschreibung eines einheitlichen Wirkmechanismus bis zum heutigen Zeitpunkt spekulativ und nicht allgemein anerkannt oder akzeptiert.

Eine Meta-Analyse von 16 epidemiologischen Datensätzen der letzten Jahre zeigt ein leicht verringertes Risiko für Lungenkrebs in Patienten in Verbindung mit einer guten Selenversorgung (Zhuo et al., 2004). Die statistische Analyse dieser Daten zeigte insbesondere einen Effekt im Vergleich von schlecht (Aufnahme < 55 µg/d;

Serum < 100 µg/L) zu gut versorgten Populationen. Darüber hinaus ergab eine Subgruppenanalyse keine klaren Ergebnisse beim Vergleich von durchschnittlich zu gut versorgten Gebieten, was die Existenz eines Selen-Schwellenwertes vermuten lässt. Die Ergebnisse des *Nutrition Intervention Trial* (Linxian, China) zeigen eine inverse Korrelation zwischen der Serum-Selenkonzentration und der Mortalitätsrate für Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre sowie für Magenkrebs (Wei et al., 2004). Populationsbasierte Fall-Kontroll-Studien hingegen liefern nur wenig Evidenz für eine Verbindung von Selenstatus und Prostatakrebs. Allerdings korreliert ein schlechter Selenstatus (Se-Konzentration und SePP) mit der Progression und Malignität in Prostatakrebspatienten (Meyer et al., 2009). Die Auswertung von Fall-Kontroll-Studien innerhalb prospektiver Kohorten ergab jedoch in den meisten Fällen ein vermindertes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken, wenn eine gute Selenversorgung vorlag (Peters und Takata, 2008).

Neuere experimentelle Studien weisen mittlerweile auch auf eine direkte Beteiligung von SEPP an den vorab beschriebenen Effekten hin (Gonzalez-Moreno et al., 2011, Steinbrecher et al., 2010).

Die Bildung kolorektaler Polypen stellt eine Vorstufe von Darmkrebs dar (Weingarten et al., 2005). Zahlreiche kleinere Studien (Fallzahl < 50) zeigen, wenn auch nicht immer signifikant, eine inverse Korrelation von Selenstatus und Inzidenz des Auftretens kolorektaler Adenome und Tumoren (Bjelakovic et al., 2006, Bjelakovic et al., 2004). Der *Wheat Bran Fiber Trial* (Alberts et al., 2000), der *Polyp Prevention Trial* (Schatzkin et al., 2000) und die *Polyp Prevention Study* (Greenberg et al., 1994) sind drei Interventionsstudien zur Untersuchung des Wiederauftretens von kolorektalen Adenomen nach erfolgter Resektion. Zwar lag das Augenmerk dieser Studien nicht auf einer direkten Intervention mit Selen, jedoch zeigte sich ein inverser Zusammenhang vom Serum-Selenstatus zur erneuten Ausbildung von Adenomen. Der Vergleich des höchsten Quartils (Median: 150 µg/L) mit dem niedrigsten (Median: 113 µg/L) ergab ein signifikant verringertes Rezidivrisiko (Jacobs et al., 2004).

Neben diesen Arbeiten zeigen auch Studien mit definierter diätetischer Se-Intervention, Auswirkungen auf das allgemeine Krebsrisiko. Der kombinierte Behandlungsansatz von Se, β-Carotin und Vitamin E ergab eine Reduktion der Krebsmortalität, sowie Inzidenz für Speiseröhren- und Magenkrebs (Blot et al., 1993, Mark et al., 2000). Obwohl die Gabe in Kombination erfolgte, deuten die Ergebnisse von Nachfolgestudien auf eine wichtige Rolle von Selen an den vorliegenden Effekten hin (Wei et al., 2004).

Einen großen Anteil zur Akzeptanz der anti-kanzerogen Eigenschaften von Se lieferte der *Nutritional Prevention of Cancer-Trial* (NPC-Trial). Das Studiendesign dieser randomisierten

klinischen Studie beinhaltete eine Selensupplementation (200 µg/d) in Form von selenangereicherter Hefe bei 1312 Bürgern in östlichen Regionen der USA, zur Untersuchung der Rezidivrate von Nicht-Melanom-Hautkrebs (NMH) (Clark et al., 1996). Die initiale Grundlage für diese Studie waren frühere Beobachtungen, die ein gehäuftes Auftreten von NMH in Regionen mit vergleichsweise niedrigen Boden-Selenkonzentrationen zeigten (Clark et al., 1984). Da zwar ein Effekt auf das primäre Studienziel (Rezidivrate von NMH) ausblieb, aber Auswirkungen auf andere Krebsarten beobachtet wurden, folgte 1993 eine Auswertung der Studie in Bezug auf Lungen-, Prostata- und Darmkrebs. Ein erster Report zeigte eine statistisch signifikante Abnahme der Inzidenz für diese drei Krebsarten, sowie der gesamten Krebsmortalität und der Gesamt-Krebs Inzidenz. Verstärkt zeigte sich dies vor allem im Tertil mit den geringsten initialen Serum-Selenkonzentrationen (< 121 µg/L) (Clark et al., 1996). Die weitere Aufarbeitung der Daten über einen erhöhten *Follow-up* Zeitraum (> 7 Jahre) resultierte in einer Abschwächung der Se-abhängigen Effekte. Das Auftreten von Darm- und Lungentumoren zeigte sich nur noch moderat und nicht mehr signifikant reduziert. Der signifikante Effekt auf Prostatakrebs sowie die gesamte Krebsinzidenz und krebisbedingte Sterblichkeit konnte bestätigt werden. Insbesondere Männer und ehemalige Raucher profitierten hierbei von einer Supplementation mit Selen (Duffield-Lillico et al., 2002). Viel Hoffnung wurde deshalb in eine groß angelegte (> 32.000 männliche Teilnehmer) und kostspielige Studie (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trail*, SELECT) mit dem primären Ziel der Prostatakrebsprävention gelegt. Leider zeichnete sich in den ersten Zwischenberichten ab, dass das Studienziel nicht erreicht werden kann. In Verbindung mit einem tendenziell erhöhten Diabetesrisiko führte dies zur Einstellung der aktiven Supplementation. Im Gegensatz zum NPC-Trial konnten für diese Studie jedoch fast ausschließlich gut versorgte männliche Teilnehmer gewonnen werden, was die ausbleibenden Effekte durchaus plausibel erscheinen lässt.

Da aber gerade die USA zu den gut mit Selenversorgten Ländern zählen (vgl. Tabelle 1), wäre eine Studie ähnlicher Größenordnung in Selenmangelgebieten wohl aussichtsreicher gewesen. Dies steht auch im Einklang mit den verringerten präventiven Effekten im Bereich der gut versorgten Studienteilnehmer des NPC-Trials (Duffield-Lillico et al., 2002). Tatsächlich gab es Vorbereitungen für ein Projekt, im vergleichsweise schlecht versorgten europäischen Raum (*Prevention of Cancer by Intervention with Selenium*, PRECISE), jedoch fehlen bis zum heutigen Zeitpunkt die finanziellen Mittel zur Umsetzung (Rayman, 2005).

Neben diesen epidemiologischen und auf Supplementationstudien beruhenden Datensätzen wurde auch in vielen tierexperimentellen Arbeiten der Zusammenhang von

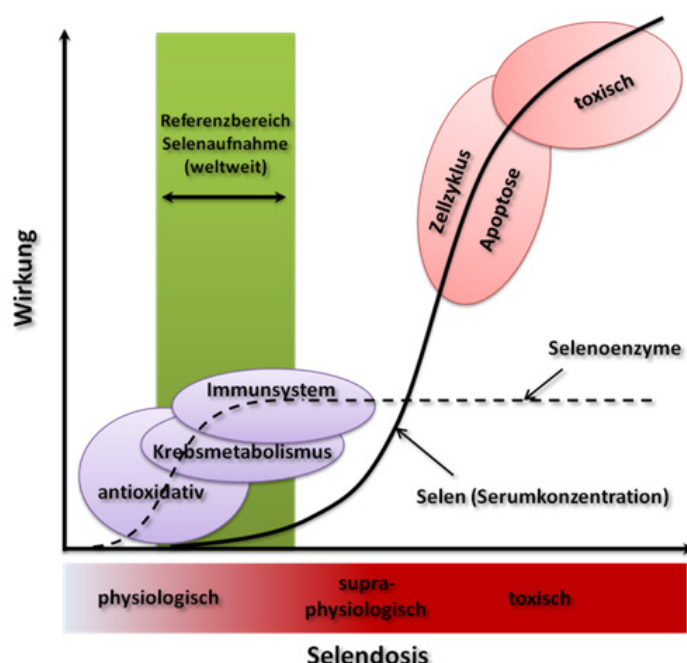
Selenstatus und Krebserkrankungen untersucht. Die Gabe supraphysiologischer Selendosen zeigt in vielen Krebsmodellen einen Einfluss auf das Tumorwachstum bei Darm- sowie Prostatakrebs und wurde schon mehrfach zusammenfassend beschrieben (Combs, 1999, Combs und Gray, 1998).

Mehrere selenresponsive molekulare Zielpunkte konnten bisher identifiziert werden. Zellkulturexperimente wiesen eine Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 nach, die eine dadurch erhöhte DNA-Reparaturrate bedingt (Seo et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) reguliert die Expression anti-apoptotischer Gene und eine Stimulation durch Selen bewirkte eine reduzierte Aktivierung in Prostatakrebszellen (Christensen et al., 2007). Weitere Effekte zeigten sich für Caspase 8 (Apoptose), p21 (Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen), Proteinkinase C und Androgenrezeptoren (Gao et al., 2004, Lu et al., 2001, Oberley und Zhong, 2001, Rayman, 2005).

Die Supplementation mit verschiedenen Selenverbindungen führt zu einer Reduktion der Cyclooxygenase- (COX) Aktivität und dem damit einhergehenden Tumorwachstum in Darmkrebszelllinien (Baines et al., 2002, Rao et al., 2001). Viele biologische Effekte im Organismus werden über Selenoenzyme vermittelt, wobei einige (GPX, TXNRD, SEPP, SELP15) auch im Gastrointestinaltrakt oder der Prostata exprimiert werden (Kipp et al., 2009, Mork et al., 1998, Wingler et al., 1999). Die antioxidative Wirkung vieler Selenoproteine in Abhängigkeit von der Selenaufnahme ist gut beschrieben und kann durch die Reduktion von oxidativen Stress der Entstehung von Tumoren entgegenwirken (Emerit, 1994, Peters und Takata, 2008). Als androgen kontrolliertes Organ ist die Prostata mit fortschreitendem Alter erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt, der auch die Tumorprogression fördert (Ripple et al., 1997). Gleiches gilt für den Darmtrakt, dessen Epithelzellen einer ständigen Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus der Nahrung ausgesetzt sind (Lupton et al., 2004). Das Auftreten von Entzündungen begünstigt zusätzlich das Wachstum kolorektaler Tumore (Clevers, 2004, Itzkowitz und Yio, 2004) und stellt ein weiteres Wirkungsfeld von protektiven Selenoenzymen dar.

Mäuse mit gestörter Expression für Gpx1 und Gpx2 zeigen eine erhöhte Anfälligkeit für bakterieninduzierte Inflammation und die Entstehung intestinaler Tumore. Sie unterstützen somit eindrucksvoll die geschilderten Zellkulturexperimente. Zudem verfügt SepP über ein Zytokin-responsive Elemente im Promotorbereich (Dreher et al., 1997, Mostert et al., 2001) und zeigt eine verringerte mRNA-Expression im Tumorgewebe (Al-Taie et al., 2004) und könnte somit ein Bindeglied der entzündungsbedingten Effekte sein.

Eine kontinuierliche Steigerung der Selen-Supplementation führt, bis zum Erreichen eines Schwellenwertes, zur Steigerung der Expression von Selenoproteinen in einer hierarchischen Abfolge (Berry, 2005). Die benötigte Selenzufuhr variiert hierbei aber von Mensch zu Mensch und führte zu der Fragestellung, ob ein Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Enzymaktivität vorliegt. Nach der Identifikation von Polymorphismen in den Genen krebsassoziiierter Selenoenzyme (*GPX 1-4*, *SEPP*, *TXNRD1*), konnte für *SEPP* und *TXNRD1* ein signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorprogression und dem Vorhandensein bestimmter genetischer Varianten gezeigt werden (Peters et al., 2008).



**Abbildung 6: Graphisches Modell zur Rolle von Selen in der Krebsprävention.** In Abhängigkeit von der diätetischen Versorgung mit Selen werden unterschiedliche anti-kanzerogene Mechanismen vermutet. In erster Instanz wirkt die Steigerung der Selenkonzentration hauptsächlich Selenoenzym-vermittelt auf das Immunsystem oder direkt auf den Krebsmetabolismus. In supra-physiologischen Konzentrationen entwickelt Selen einen zunehmend toxischen Charakter (Combs und Gray, 1998).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der erwähnten Studien zeigen die Komplexität der anti-kanzerogenen Eigenschaften und potentiellen Mechanismen von Selen im Säugerorganismus. In Abhängigkeit von der Art und Menge der aufgenommenen Selenform, der genetischen Voraussetzungen und der Krebsart scheinen multiple Wirkmechanismen zu coexistieren, die sowohl für sich als auch in Kombination zur präventiven Wirkung beitragen (Abb. 6).

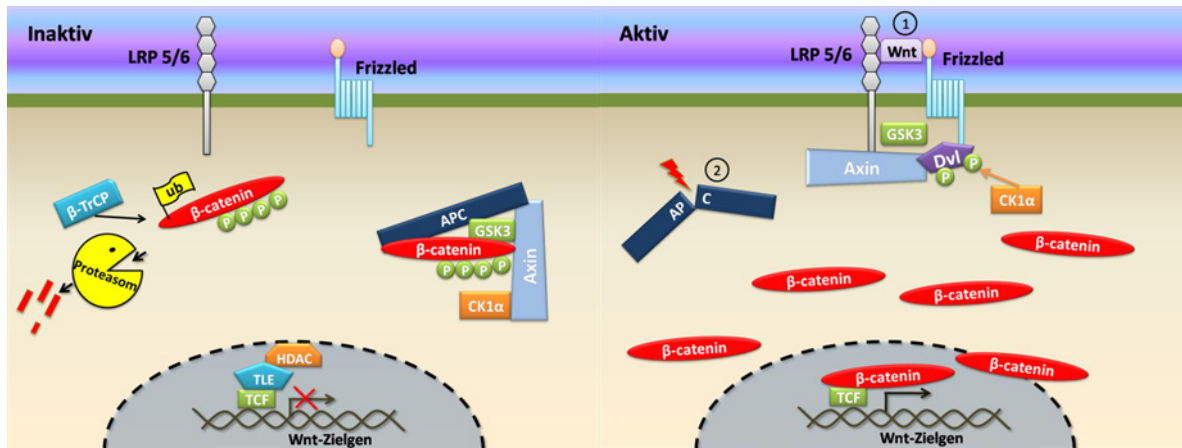
## 1.4 Ausgewählte Tiermodelle der Krebs- und Selenforschung

Im Rahmen dieser Arbeit fanden verschiedene Tiermodelle der Selenforschung in Kombination mit einem sehr etablierten Modell der Darmkrebsforschung Verwendung. Zum besseren Verständnis sind im Folgenden die speziellen Charakteristika der einzelnen Mauslinien beschrieben.

### 1.4.1 $Apc^{min/+}$ -Darmkrebs-Mausmodell

Erstmals wurde die  $Apc^{min/+}$  ( $Apc^{min}$ ) Maus im Jahr 1990 mit der Eigenschaft zur Ausbildung multipler intestinaler Neoplasien (min) charakterisiert (Moser et al., 1990). Eine Mutation im Tumorsuppressorgen *Apc* führt zur Ausbildung exophytischer Adenome, aber selten erreicht die Tumorprogression das Stadium invasiver Karzinome. Die durchschnittliche Lebenserwartung heterozygoter Tiere liegt bei ca. 120 Tagen; homozygote Tiere sind nicht lebensfähig. Ähnliche Mutationen zeigen sich in vielen sporadisch auftretenden Krebsarten und der erblichen Erkrankung FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis) (Rustgi, 2007). Kommt es nicht frühzeitig zur chirurgischen Behandlung (Polypenresektion, Teilresektion des Darmes) der FAP Patienten, führt dies zur Entstehung kolorektaler Adenome.

Das initiale Ereignis zur Entstehung der beschriebenen neoplastischen Veränderungen ist ein spontaner Verlust des zweiten *Apc*-Allels. Dieser sog. „loss of heterozygosity“ (LOH) zeigt sich auch schon in den frühesten Stadien untersuchter Läsionen (Levy et al., 1994). Da APC ein negativer Regulator des kanonischen Wnt-Signalwegs ist, kommt es in Abwesenheit von funktionalem APC nicht zur Komplexbildung mit  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat). Dies verhindert die Phosphorylierung von  $\beta$ -Cat und den Abbau durch das Proteasom. Durch die Inaktivierung des Abbaukomplexes kommt es somit zur Anreicherung von  $\beta$ -Cat, welches im Zellkern an Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie bindet. Dies führt zur Expression von Wnt-Zielgenen, die über ihren Einfluss auf die Zellproliferation die Tumorentstehung auslösen (Barker und Clevers, 2006).



**Abbildung 7: Wnt/β-Catenin-Signalweg.** In der Abwesenheit des Liganden Wnt wird zytoplasmatisches β-Catenin durch einen Multiproteinkomplex gebunden, der aus Axin, APC, GSK3 und CK1α besteht. Hierbei kommt es zur Phosphorylierung durch CK1α und GSK3 und weiterführend zur Ubiquitinierung des β-Catenin durch β-TrCP, was den proteasomalen Abbau von β-Catenin zur Folge hat. Der Transkriptionsfaktor TCF wird durch weitere Co-Faktoren (TLE, HDAC) an der Expression von Wnt-Zielgenen gehindert. (1) Bindet Wnt an seinen Rezeptorkomplex, bestehend aus Frizzled und dem Co-Rezeptor LRP 5/6, kommt es zu einer Ereigniskaskade, die die beschriebene Bindung und Degradierung von β-Catenin verhindert. β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma, transloziert in den Nukleus und aktiviert über TCF die Transkription. (2) Mutationen im APC-Gen verhindern ebenso die Ausbildung des Degradationskomplexes, was auf diese Weise in einer Anreicherung des fortlaufend gebildeten β-Catenins im Zytoplasma und Zellkern führt und die Aktivierung des Signalweges auslöst. (**APC**, Adenomatous polyposis coli; **GSK3**, Glykogen Synthase 3; **CK1α**, Casein Kinase 1α; **β-TrCP**, Transducing repeat containing protein; **TCF**, T-cell factor; **HDAC**, Histone deacetylase; **TLE**, Transducin-like Enhancer of split; **LRP**, Low density lipoprotein receptor related protein; **Dvl**, dishevelled). Abbildung modifiziert nach (MacDonald et al., 2009).

Durch die molekular gut erfolgte Charakterisierung und den hohen Grad der Reproduzierbarkeit eignet sich dieses Tumormodell ideal zur Untersuchung genetischer und diätetischer Interventionen der intestinalen Tumorigenese.

Gerade durch die hohe Anzahl an ausgebildeten Adenomen (ca. 100 nach 120d in heterozygoten  $Apc^{min}$  Mäusen unter Kontrollbedingungen) ist eine verlässliche Auswertung der Tumorigenese in quantitativer Weise möglich.

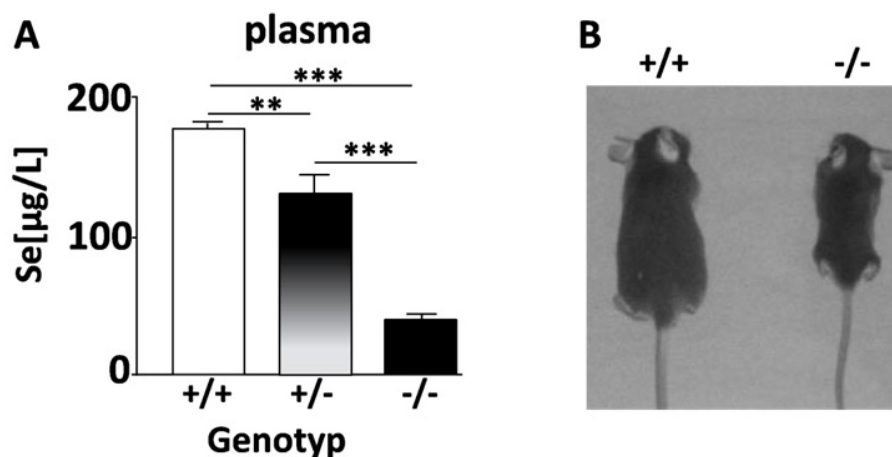
#### 1.4.2 Selenoprotein P KO-Mauslinie ( $SepP^{-/-}$ )

Erstmals beschrieben wurde die  $SepP^{-/-}$ -Maus nahezu gleichzeitig von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen im Jahr 2003 (Hill et al., 2003, Schomburg et al., 2003). Die homozygoten KO-Tiere zeigten einen komplexen Phänotyp, der sich partiell aber durch eine erhöhte diätetische Selenversorgung kompensieren ließ. Ohne eine erhöhte Se-Supplementation zeigen die Mäuse ein reduziertes Wachstum (Abb. 8B), entwickeln eine progressive Ataxie der hinteren Extremitäten und altersunabhängige neurologische Störungen (Hill et al., 2004, Schweizer et al., 2005). Männliche Tiere sind aufgrund strukturelle Abnormitäten der



reifenden Spermien infertil, unabhängig von der diätetischen Selenversorgung (Olson et al., 2005).

Viel entscheidender sind aber die vorliegenden und stark veränderten Gewebe-Selenkonzentrationen in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp, die auch zur Aufklärung der biologischen Rolle von SepP als Transport und Speicherprotein für Selen im Organismus beigetragen haben. Heterozygote und homozygote Knockout-Mäuse zeigen deutlich reduzierte Plasma-Selenkonzentrationen (Abb. 8A), sowie daraus resultierende erniedrigte Konzentrationen in den peripheren Organen (Niere, Tests, Gehirn).



**Abbildung 8: Die *SepP*<sup>-/-</sup>-Maus.** A) Plasmatische Selenkonzentrationen in Abhängigkeit vom *SepP*-Genotyp. B) Wachstumsdefizit der *SepP*-KO-Maus im Vergleich zum Wildtyp (Schomburg et al., 2003).

Aufgrund der phänotypischen Unauffälligkeit der heterozygoten Tiere, ermöglicht dieses genetische Tiermodell somit die Untersuchung einer genetisch bedingten Selenunterversorgung, wie sie sich z.B. in Individuen mit unvorteilhaftem Genotyp aufgrund von SNPs in essentiellen Komponenten der Selenoproteinbiosynthese und Selenverteilung entwickelt. In Kombination mit einer limitierten Selenversorgung, wie sie z.B. Europa vorliegt, lassen sich wertvolle Hinweise auf die Interaktion von Ernährung und Genotyp für die Tumorigenese in diesem Mausmodell beim Vergleich *SepP*<sup>+/+</sup> vs. *SepP*<sup>+/-</sup> gewinnen.

#### 1.4.3 Leberspezifische hSEPP-transgene Mauslinie (tg<sup>hSEPP</sup>)

Als weiterer muriner Modellorganismus zur Erforschung der Selenoprotein P-vermittelten Effekte dient die transgene Mauslinie tg<sup>hSEPP</sup> (Renko et al., 2008). Unter der Kontrolle eines Transthyretin (TTR)-Promotors wird das *hSEPP*-Transgen leberspezifisch exprimiert. Durch

das Einkreuzen dieser Linie in die *SepP*<sup>-/-</sup>-Mauslinie kann die Fertilität männlicher Tiere wiederhergestellt werden und der neurologische Phänotyp, sowie das Wachstumsdefizit sind nicht mehr nachweisbar. Dies zeigt die Abhängigkeit bestimmter Gewebe von der Selenversorgung durch SepP über den Blutkreislauf.

Die tg<sup>hSEPP</sup>-Maus bietet somit die Möglichkeit, die Auswirkungen einer verbesserten plasmatischen Selenversorgung durch SEPP zu untersuchen.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung des transgenen Konstruktes.** Die humane *SEPP* cDNA mit dem 3'-UTR und beiden SECIS Elementen wurde in das Exon2 eines pTTR Vektors eingefügt(Renko et al., 2008).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht weitergehend vermerkt, in *pro analysi* – Qualität von nachstehenden Händlern bezogen:

ABgene ThermoFisher (Epsom, UK)

Bio-Rad (München, Deutschland)

Boehringer (Mannheim, Deutschland)

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Roche Diagnostik (Mannheim, Deutschland)

Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

VWR International (Hannover, Deutschland)

#### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden Verbrauchsmaterialien für den üblichen Laborbedarf bei folgenden Firmen bestellt:

Braun Biotech International (Melsungen, Deutschland)

Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Invitrogen (Carlsbad, California, USA)

Merck Biosciences (Schwalbach, Deutschland)

peqLab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)

Sarstaedt (Nümbrecht, Deutschland)

Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

VWR (Darmstadt, Deutschland)

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, nach dem labortechnischen Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook und Russell, 2001) angefertigt. Das zur Herstellung benötigte Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O) wurde durch das Gerät „Easypure™ UV“ (Barnstead International, Dubuque, USA) gewonnen.

### 2.1.4 Reaktionssysteme (Kits)

In Tabelle 4 aufgelistet sind alle gebrauchsfertigen Reaktionssysteme, die zur Anwendung kamen.

**Tabelle 4: Reaktionssysteme**

<b>Reaktionssystem</b>	<b>Hersteller</b>
ABsolute™ qPCR SYBR® Green Mix	Abgene (Epsom, UK)
peqGold RNA-Pure™	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories (München)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Lincoplex Cytokine Immunoassay Kit	Millipore (Billerica, MA, USA)
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)

### 2.1.5 Geräte

Soweit nicht gesondert vermerkt wurden Laborgeräte entsprechend Tabelle 5 verwendet.

**Tabelle 5: Geräte**

Gerät	Hersteller
Analysenwaage CP 423S	Sartorius (Göttingen)
Autoklav Varioklav	Varioklav, H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss (Oberkochen)
Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
DELTA PlateShake	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Elektrophoresekammer (horizontal)	Roth (Karlsruhe)
iCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories (München)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Leica RM2125RT Mikrotom	Leica (München)
Magnetrührer Modell L32	A. Hartenstein (Würzburg)
Microdismembrator Modell U	B. Braun Biotech (Melsungen)
Mikrowelle M501	Whirlpool (Schorndorf)
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop Stereomikroskop SZ2	Olympus (Hamburg)
Mikroskop Wilovert 30 Standard	Hund (Wetzlar)
Netzgerät BluePower PLUS	SERVA (Heidelberg)
Netzgerät EPS 601 Power Supply	Amersham Biosciences (Freiburg)
PCR-Cycler, Primus 25 und 96plus	MWG Biotech (Ebersberg)
pH-Meter inoLab Benchtop	WTW (Weilheim)
Photometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Pipetten Eppendorf research (2,5µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand (Wertheim)
Präparierbesteck	FST Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
qPCR-Cycler iCycler	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Reinstwasser-Anlage EASYpure UVTM	Barnstead Int. (Dubuque, Iowa, USA)
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica Microsystems (Nussloch)
Spectrophotometer U-2001	Hitachi (Deutschland)
Schüttler Histologie	Edmund Bühler GmbH (Hechingen)
S2-Picofox	Bruker Nano GmbH (Berlin)
Tischphotometer Biophotometer	Eppendorf (Hamburg)
Tissuelyser	Qiagen (Hilden)
Ultraschallstab Labsonic M	B. Braun Biotech (Melsungen)
Vortex	A. Hartenstein (Würzburg)
Waage CP 2201, CP323S, Ultramicro 4504MP8	Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

## 2.1.6 Software und Datenbanken

Tabelle 6 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der benutzten Programme und Datenbanken.

**Tabelle 6: Software und Datenbanken**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Anbieter</b>
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH (München)
Axio Vision Rel. 4.7	Carl Zeiss MicroImaging (Göttingen)
Bio-Rad iCycler iQ 3.0	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA/USA)
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
Blat Search	UCSC Genome Browser Project
DAVID Bioinformatics Resources 6.7	<a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov/">http://david.abcc.ncifcrf.gov/</a>
Electronic PCR	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/</a>
Endnote	Thomson Reuters (New York)
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland (Unterschleißheim)
Mouse Genome Informatics (MGI)	<a href="http://www.informatics.jax.org">http://www.informatics.jax.org</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM</a>
SPSS	IBM Corporation (New York)
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed</a>
Primer 3 Version 4.0	<a href="http://frodo.wi.mit.edu">http://frodo.wi.mit.edu</a>
REST version 1.9.12	erstellt durch M. Herrmann, D. Chiew (Corbett Life Science Sydney, Australia) und Michael W. Pfaffl (Technische Universität München, <a href="http://rest.gene-quantification.info">http://rest.gene-quantification.info</a> )
Sigma Plot	Systat Software GmbH (Erkrath)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimentelles Arbeiten

#### 2.2.1.1 Mauslinien und Zucht

Die Zucht und Haltung der im Folgenden beschriebenen Mauslinien, wurde zentral in der Versuchstierhaltung des Forschungshauses am Campus Virchow Klinikum (CVK) vollzogen. Bei der Haltung wurden die Vorgaben der zuständigen lokalen Behörden eingehalten. Soweit nicht anders beschrieben, erhielten die Versuchstiere Standard-Nager-Diät (Haltungsfutter 1326, Zuchtfutter 1314, Altromin, Lage). Trinkwasser wurde ad lib. verabreicht. Alle experimentellen Eingriffe waren vorab genehmigt (LaGeSoNr.: G0171/06; G0045/10) und wurden durch qualifiziertes Fachpersonal durchgeführt.

Als Modell für die intestinale Tumorigenese wurde die Mauslinie APC<sup>min</sup> der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA, C57BL/ 6J-APC<sup>min</sup>/J) verwendet. Um die Auswirkung eines veränderten Selentransports ins Zielgewebe zu untersuchen, wurde auf die in Vorarbeit generierten Mauslinien *SepP*-KO (Schomburg et al., 2003) und tg<sup>hSEPP</sup> (Renko et al., 2008) zurückgegriffen. Alle verwendeten Tiermodelle sind auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund zurückzuführen. Hierbei handelt es sich um den C57/Bl6-Inzuchtstamm. Bei der Zucht der Tiere erfolgte die Übertragung des Min-Allels vorwiegend über die väterliche Seite, zur Vermeidung zusätzlichen körperlichen Stresses der Weibchen während der Trächtigkeit.

#### 2.2.1.2 Spezialdiäten

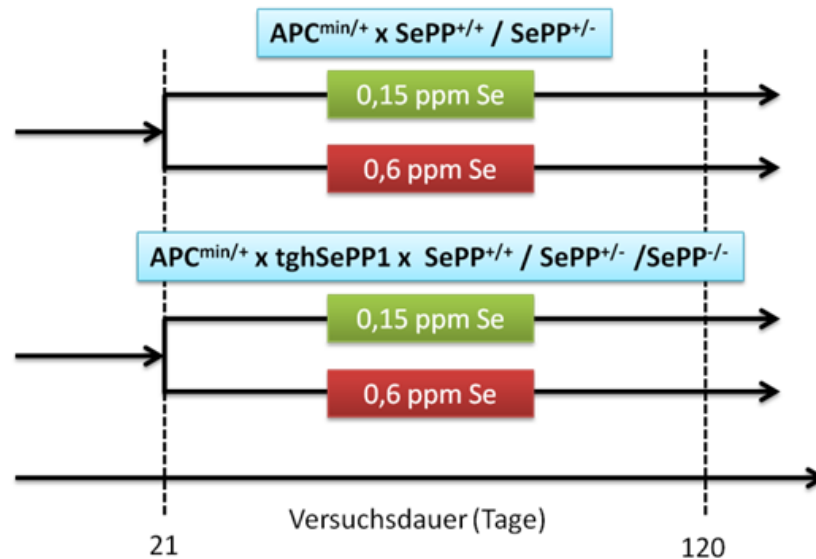
Ausgehend von einer Selen-armen Diät (Altromin, C1045) wurden durch definierte Zugabe von Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> definierte selenhaltige Nagerdiäten hergestellt. Durchgeführt wurde die Herstellung am Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke und in Kooperation mit Dr. Michael Haack, *ibid*. In Wasser gelöstes Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> wurde dem Ausgangsfutterpulver beigemischt und anschließend pelletiert. Die finalen Werte für die resultierenden Spezialfutter sind in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Spezialdiäten**

Diät	Selengehalt (ppm)
RDA	0,15 ± 0,17 (n=5)
highSe	0,61 ± 0,15 (n=5)

#### 2.2.1.3 Versuchsdesign

Die Zucht der Versuchstiere erfolgte entsprechend der beschriebenen Angaben. Nachdem Absetzen der Tiere (am postnatalen Tag, P21) erfolgte die Gabe der Nagerdiäten entsprechend des Versuchsprotokolls. Alle Versuchsgruppen wurden bis zum Alter von 120 Tagen getrenntgeschlechtlich gehalten, und die Aufteilung der Versuchsgruppen erfolgte entsprechend Abbildung 10.



**Abbildung 10: Graphische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des tierexperimentellen Versuchsteils.** Ab Tag P21 erfolgte die Gabe von Nagerdiäten mit entsprechenden Selenkonzentrationen bis P120. Zum finalen Versuchszeitpunkt wurden die Tiere getötet und der Intestinaltrakt präpariert.

#### 2.2.1.4 Präparation und Probenaufarbeitung

Die Tötung der Tiere wurde durch Begasung mit  $CO_2$  im Alter von 120 Tagen herbeigeführt. Nach dem Durchtrennen der Lebervene wurde das dadurch gewonnene Vollblut für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert ( $4^\circ C/10.000\text{ g}/10\text{ min}$ ). Der resultierende Serumüberstand wurde aliquotiert, in Flüssigstickstoff ( $N_2^{\text{flüssig}}$ ) überführt und bei  $-80^\circ C$  eingelagert.

Der Intestinaltrakt wurde komplett entnommen und von Geweberesten befreit. Der Dünndarm wurde in drei gleich große Abschnitte geteilt, längs geöffnet und vorsichtig unter Zuhilfenahme eines weichen Pinsels mit PBS gesäubert. Analog wurde diese Vorgehensweise für das komplette Kolon angewandt. Die einzelnen Abschnitte wurden auf Whatman®-Papier in anatomischer Reihenfolge (Dünndarm: proximal, medial, distal; Grimmdarm) platziert und in Fixierlösung denaturiert ( $4^\circ C$ , 24-48 h). Anschließend wurde eine Kontrastfärbung durch Methylenblau-Färbelösung (RT, 2-3 min) durchgeführt.

10 x PBS:	137 mM NaCl, 4,3 mM $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$ , 2,7 mM KCl, 1,4 mM $KH_2PO_4$ , pH 7,4 einstellen mit HCl
Fixierungslösung:	3,7% (v/v) Formaldehyd in 1 x PBS
Färbelösung:	0,01% (w/v) Methylenblau in 1 x PBS



### 2.2.1.5 Quantifizierung der Tumorigenese

In Zusammenarbeit mit meinem Kollegen Dipl. Biologe Tobias Endermann wurde die Tumoranzahl bestimmt und eine Kategorisierung nach Tumordurchmesser vorgenommen. Gezählt wurden die Tumore aller gewonnenen Darmabschnitte unter Vergrößerung durch ein Binokular (Stereomikroskop, Olympus, Hamburg). Die einzelnen Tumorgrößen wurden durch eine selbst angefertigte Schablone bestimmt, welche eine Abstufung in 0,5 mm Schritten ermöglichte (0,5-3 mm Durchmesser). Kleinere oder größere Tumore wurden gesondert in die Tumorauszählung aufgenommen (S=small, L=large) und gingen nicht mit in die Gesamtflächenbestimmung ein. Alle Därme wurden durch jeweils zwei den Versuchsbedingungen gegenüber geblindeten Personen ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt.

## 2.2.2 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Extraktion genomischer DNA

Das für eine DNA-Isolierung benötigte Gewebe wurde mittels Ohrstanzen bei der Markierung der Versuchstiere gewonnen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 50 µl ALK-Puffer für 2 Stunden bei 95°C in PCR-Tubes. Das resultierende Lysat wurde dann mehrfach resuspendiert und 50 µl NEUT-Puffer zugegeben. Das gesamte Volumen wurde nochmals gevortext und diente dann direkt als Template in der PCR.

ALK-Puffer (Alkalische Lyse-Puffer):	25 ml ddH <sub>2</sub> O, 62,5 µl 10 M NaOH, 10 µl 0,5 M EDTA, pH 12
NEUT-Puffer (Neutralisations-Puffer):	24 ml ddH <sub>2</sub> O, 1 ml 1 M Tris-HCl, 45 µl 37% HCl pH 5

### 2.2.2.2 Polymerase Kettenreaktion(PCR)

Die Sequenzen der verwendeten Primer zur Genotypisierung der einzelnen Tiermodelle (Apc<sup>min</sup>, SepP<sup>-/-</sup>, tg<sup>hSEPP</sup>) sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Informationen und PCR-Bedingungen wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) zur Verfügung gestellt, bzw. waren bereits im Labor etabliert. Die gewonnene genomische DNA wurde anhand des nachstehenden etablierten Protokolls in der PCR eingesetzt:

**Pipettierschema:**

ddH <sub>2</sub> O	18,25 µl
10 x PCR-Puffer*	2,5 µl
MgCl [25 mM]	1 µl
dNTPs [10 mM]**	0,5 µl
Primer 1,2,3 [10 µM]	je 1 µl
Taq-DNA-Polymerase*	0,2 µl
cDNA	1 µl
<b>Reaktionsvolumen</b>	<b>26,45 µl</b>

\* Genecraft (Lüdinghausen); \*\* Amersham (Freiburg)

**PCR-Programm:**

Initiale Denaturierung	94°C	15 min
45 Zyklen		
Denaturierung	94°C	15 sek
Primer-Annealing	53°C	15 sek
Elongation	72°C	15 sek
Finale Elongation	72°C	3 min

**Tabelle 8: Verwendete Primer zur Genotypisierung**

Gen	Sequenz	Fragmentgröße
<b>SepP<sup>-/-</sup></b>		
Fw-SepPvorn	ATAGGACAACCTCAGCAATGTG	wt = 200 bp
Rev-SePP-vorne_p200	CAAGTATCAGCTGGCTTGAAGA	
Rev-lacZ_P262	CGGGCCTCTTCGCTATTAC	het = 262 bp
<b>tg<sup>hSEPP</sup></b>		
Fw-hSEPP-RTPCR	TATGATAGATGTGGCCGTCTTG	tg <sup>hSEPP/+</sup> = 226 bp
Rev-hSEPP-RTPCR	TGTGATGATGCTCATGATGGTA	
<b>Apc<sup>min</sup></b>		
F-mAPCjax	GCCATCCCTTCACGTTAG	wt = 600 bp min/+ = 1000/600/340 bp
F-mAPC2jax	TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA	
R-mAPCjax	TTCCACTTTGGCATAAGGC	

**2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Zu 5 µl aus der PCR-Reaktion wurde 1 µl DNA-Probenpuffer gegeben und das Gesamtvolumen auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Zur eindeutigen Auswertung wurde ebenfalls ein DNA-Größenstandard (1 kb DNA Ladder Generuler™ Plus, Fermentas,

Kanada) mitgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Ethidiumbromid-haltigen Gel für 30 min und einer Spannung von 220 V. Die resultierenden Banden wurden unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

SB-Puffer (20 x):	36,5 mM Borsäure, 10 mM NaOH in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,5 einstellen mit H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
DNA-Probenpuffer (6 x):	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (w/v) Glycerin in ddH <sub>2</sub> O

#### 2.2.2.4 RNA-Isolierung aus Tumorgewebe

Um RNA aus Tumorgewebe gewinnen zu können, wurde bei der Probennahme auf eine Fixierung des entsprechenden Gewebes verzichtet. Nach der Entnahme der zu analysierenden Darmabschnitte wurden diese auf Whatman®-Papier überführt und umgehend mit RNAlater gesäubert und bei 4°C aufbewahrt. Innerhalb von 2 Wochen wurden Tumore unterschiedlicher Größen unter dem Binokular vom Darmgewebe mit einem Skalpell abgetrennt und in separate 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. RNAlater wurde, wenn nötig, zugeben, bis das gesamte Tumormaterial bedeckt war und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung weggefroren.

Die Isolierung der RNA wurde mit peqGold RNA-Pure™, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dieses Protokoll beruht auf der bereits 1987 beschriebenen Guanidinisoithiocyanat (GTC)-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987). Ein bis zwei Spatelspitzen Tumorgewebe wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, möglichst wenig RNAlater zu verschleppen, und mit 1 ml peqGold RNA-Pure™ versetzt. Dem Reaktionsgefäß wurde eine Keramikugel zugesetzt und für 5 min im TissueLyser (Qiagen, Hilden) geschüttelt, um einen maximalen Gewebeaufschluss zu gewährleisten. Es wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und abermals für 15 sek geschüttelt. Darauf folgte eine Inkubation bei RT für 10 min und die Probe wurde bis zur vollständigen Phasentrennung abzentrifugiert (4°C, 14000 g, 5 min). Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Zugabe von 500 µl Isopropanol sowie ein weiterer Inkubationsschritt (4°C, 5 min) führte zum Ausfällen der RNA. Um eine Pelletbildung zu erreichen, wurde der Ansatz zentrifugiert (4°C, 14000 g, 5 min) und der Überstand daraufhin verworfen. Das Pellet wurde dann zwei- bis drei-mal mit Ethanol (75 %) gewaschen und an der Luft getrocknet. Abschließend erfolgte die Resuspension der präzipitierten RNA in 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O unter leichtem Schütteln (55°C, 5-10 min, Thermoschüttler).

Die Konzentrationen sowie die Reinheit der RNA wurden photometrisch am Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm bestimmt. Abschließend wurden die RNA-Präparation durch Verdünnung mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf eine einheitliche Konzentration von 200 ng/μl eingestellt und die Proben dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Eine Aussage über die Reinheit konnte durch das Verhältnis der Absorptionswerte der unterschiedlichen Wellenlängen getroffen werden. Der Quotient beider Wellenlängen (260 nm/280 nm) sollte hierbei einen Wert zwischen 1,6 und 2,0 haben.

RNAlater:	6,1 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM EDTA, 25 mM Na <sub>3</sub> -Citrat (1M), pH 5,2 mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
DEPC-H <sub>2</sub> O:	0,1% (w/v) DEPC in ddH <sub>2</sub> O, 24 h offen unter dem Abzug inkubieren, dann autoklavieren

#### 2.2.2.5 RNA-Isolierung aus tiefgefrorenem Gewebe

Tiefgefrorene Organe wurden in einem ersten Schritt grob mechanisch zerkleinert. Kleinere Stücke wurden dann in vorgekühlten (N<sub>2</sub><sup>flüssig</sup>) Teflongefäßen mit einer Wolframkarbidkugel bis zur maximalen Zerkleinerung durch einen Mikrodismembrator geschüttelt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde das somit gewonnene Gewebepulver bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurde eine Spatelspitze des Gewebepulvers zusammen mit einer Keramikugel in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei den gesamten Arbeitsschritten wurde auf eine ausreichende Kühlung (N<sub>2</sub><sup>flüssig</sup>, Trockeneis) der verwendeten Materialien und Proben geachtet, um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern. Alle weiteren Schritte zur RNA-Isolierung wurden, wie bereits vorab beschrieben, durchgeführt (vgl. 2.2.2.4 RNA-Isolierung aus Tumorgewebe).

#### 2.2.2.6 RNA-Aufreinigung

Um die Qualität der isolierten RNA für spätere Microarray-Analysen zu steigern, erfolgte eine weitere Aufreinigung mittels RNEasy®-Säulen, Qiagen. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend der Herstellerangaben zur RNA-Aufreinigung durchgeführt und die auf der Säule gebundene RNA abschließend in 30 μl DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert. Zusätzlich wurde eine erneute photometrische Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 1000 durchgeführt.

#### 2.2.2.7 Microarray-Analyse

Microarrays werden weitläufig auch als Genchips oder Biochips bezeichnet und ermöglichen den umfassenden Vergleich mehrerer tausend mRNA-Expressionsmuster in nur einer Auswertung. Der verwendete Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 Array ermöglicht die Erfassung von bis zu 39000 Transkripten des Mausgenoms, die aus den Datenbanken dbEST, GenBank® und RefSeq zusammengestellt wurden. Er zählt zu den sog. „Oligonukleotide Microarrays“, bei denen Oligonukleotide *in situ* auf dem Array durch Photolithographie synthetisiert werden. Verwendet man mehrere Genchips, bietet diese Technik somit den Vorteil, in einem vergleichenden Ansatz die unterschiedliche versuchsbedingte genomweite Regulation in einem Gewebe vergleichend quantitativ zu erfassen.

Für die vorliegende Arbeit wurden, wie beschrieben, RNA-Präparationen aus Tumorgewebe hergestellt und aufgereinigt. Für eine Präparation wurden von den einzelnen Versuchstieren ca. 10 Tumore unterschiedlicher Größe vereint. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden RNA-Präparationen mit gleichem genetischen Hintergrund und gleicher Fütterungsgruppe abermals vereint. Im Labor für Funktionelle Genomforschung (LFGF) der Charité erfolgte die Durchführung weiterer Arbeitsschritte, wie die reverse Transkription, die Biotin-Markierung der RNA und die Hybridisierung des Microarrays. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software GCOS 1.4 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Die Bearbeitung der Proben sowie die computergestützte Auswertung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Ute Ungethüm und Herrn Dr. Ralf Kuban durchgeführt. Weitere Vergleiche der unterschiedlichen Expressionsraten einzelner Gene, in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen, wurden mit MS-Excel vorgenommen.

#### 2.2.2.8 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus RNA mittels reverser Transkription wurde das iScript™-System, BioRad Laboratories, München, verwendet. Entsprechend der Herstellerangaben wurden hierzu 1 µg RNA (in 15 µl DEPC-H<sub>2</sub>O) mit 4 µl 5x Reaktionspuffer (Random-Hexamer und Oligo-dT-Primer) und 1 µl Reverser Transkriptase gemischt und im Thermocycler inkubiert. Dieser cDNA-Ansatz wurde dann auf ein finales Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

**Pipettierschema:**

1 µg RNA in DEPC-H <sub>2</sub> O	15 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
<b>Reaktionsvolumen</b>	<b>20 µl</b>

**PCR-Programm:**

25°C	5 min
42°C	30 min
85°C	5 min

**2.2.2.9 Real-TimePCR (qPCR)**

Die Real-Time PCR ermöglicht die quantitative Detektion von cDNA- bzw. RNA-Mengen und kann somit zur Untersuchung von Genexpressionsmustern in zu vergleichenden Proben verwendet werden. Grundlage für die Quantifizierung ist die Fluoreszenzdetektion eines in DNA-Doppelstränge interkalierenden Farbstoffes (SYBR-Green). Die erhöhte Intensität des Fluoreszenzsignals je Zyklus korreliert mit der steigenden Menge des entsprechenden PCR-Produktes und folglich mit der initialen Menge von cDNA-Kopien. Für die vorgenommenen Untersuchungen wurde das qPCR-Reagenssystem der Firma Abgene (Thermo Fisher, Epsom, UK) verwendet und nach folgendem Schema gearbeitet:

**Pipettierschema:**

SYBR Green Mastermix	12,5 µl
Primer fwd [10 µM]	0,25 µl
Primer rev [10 µM]	0,25 µl
cDNA (< 250 ng)	5 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl
<b>Reaktionsvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Die Belegung der Mikrotiterplatten erfolgte nach einem einheitlichen Belegungsplan für das Probenmaterial und entsprechend der Herstellerangaben. Amplifiziert und gemessen wurde im Bio-Rad iCycler nach folgendem Protokoll:

**qPCR-Programm:**

Initiale Denaturierung	95°C	15 min
45 Zyklen		
Denaturierung	95°C	15 sek
Primer-Annealing	58°C	30 sek
Elongation	72°C	30 sek
Finale Elongation	72°C	3 min

Die Software des iCycler-Systems errechnete den *cycle of threshold* Wert(ct-Wert), der dann auf ein entsprechendes *housekeeping* Gen ( $\beta$ -Aktin) normalisiert wurde. Durch die Analysesoftware REST (Relative Expression Software Tool, Version 1.9.12) (Pfaffl et al., 2002) konnten statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Proben bestimmt werden.

**2.2.2.10 Primer**

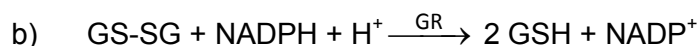
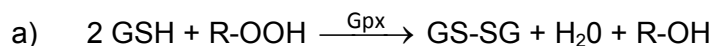
Die für die qPCR verwendeten Primer wurden für die entsprechenden Gene nach einem einheitlichen Protokoll erstellt. Alle Primer wurden Intron-überspannend ausgewählt, um die Detektion genomischer DNA zu umgehen. Mittels BLAT wurden die Exon-Intron Grenzen der NCBI Referenzsequenzen bestimmt, die Sequenzen in die webbasierte Software Primer3 4.0 übertragen und eine bestimmte Exongrenze als Zielsequenz markiert. Die Parameter für die gewünschte optimale Fragmentlänge, Schmelztemperatur sowie Primerlänge wurden festgelegt und die ermittelten Sequenzen mittels e-PCR und BLAST auf ihre Spezifität überprüft. Die Primersynthese, Entsalzung und Lyophilisierung erfolgten außer Haus durch die Firma Invitrogen (Karlsruhe). Tabelle 9 zeigt alle in der qPCR verwendeten Primer und ihre Spezifikationen.

Tabelle 9: Verwendete Primer für Real-Time PCR.

Gen	Primer_fw	Primer_rev	Fragmentgröße
<b>β-Catenin</b>	AGCTGGCCTGGTTTGATACTGAC	CTAAACCATTCCCACCCTACCAA	130 bp
<b>Tcf</b>	AAAAACATCAAGAATCCACCAC	ACAGAAGATACGAGGGTGAGTC	152 bp
<b>c-Myc</b>	AATCCTGTACCTCGTCCGATTCC	TCTTGCTCTTCTTCAGAGTCGCT	150 bp
<b>mSepP</b>	GTTGAAGAAGCCATTAAGATCG	ATTCTCTGAAGGCTTACTGCTG	204 bp
<b>Gpx-2</b>	CTTACATTGCCAAGTCGTTCTAC	GATCTCCTCGTTCTGACAGTTC	242 bp
<b>Gpx-1</b>	CGATCTCAGTGCCGTTGGCC	CAGTTCTCCTGATGTCCGAAGTGGT	204 bp
<b>Sel H</b>	GGTCATTGAGCATTGTACGAG	TCTTCAATTCTTCAACCACCTC	248 bp
<b>Sel M</b>	ATGACAGTTGAATCGCCTAAAG	GAGTGGGATTGCTCTAGTTC	151 bp
<b>Dio 1</b>	CCAGTACTTCTGGTTTGTCTCTG	GAGGCAAAGTCATCTACGAGTC	231 bp
<b>Fabp1</b>	AATTGCAGAGCCAGGAGAAC	GCTTGACGACTGCCTTGAC	231 bp
<b>Selp15</b>	ATGGTCGCCTAACTAACACTC	CAGACGCCGCTTGAAACG	227 bp
<b>Sel S</b>	CTAATGCCCAAGTTGAAAAAC	TTGGGGATGACAGATGAAGTAG	176 bp
<b>Sel W</b>	CAGCTCAAGGAGAAGCTAGAAC	GGAAGTTGCTCTCTGTATCCAC	160 bp
<b>TrxnRd1</b>	CAAATTTGACAAGAAAGTGCTG	AGTCATGCTTCACTGTGTCTTC	197 bp
<b>TrxnRd2</b>	GCAAATGTCACTTTTGGTCAC	CTTCTCCGATTCAAAGTCCTG	214 bp
<b>Lrp2</b>	GAAGGAGAGGATGAGAACAATG	ATATCTGGCAGTCATCGAAATC	184 bp
<b>Lrp8</b>	ACAACCCAGTGTACAGGAAAAC	TTCAAGACTTAATGCCACTCG	290 bp
<b>Tnfa</b>	CGTGGAACTGGCAGAAGAG	GGCTACAGGCTTGTCACTC	253 bp
<b>Il6</b>	GAAATCGTGAAATGAGAAAAG	GACTCTGGCTTTGTCTTTCTTG	243 bp
<b>Cox2</b>	GCCCAGCCTTCACCCATCAG	GACCAGGCACCAGACCAAAGAC	186 bp
<b>Mcpt1</b>	ATACATGGGAGACTCTGGGGGACC	GGCTTGGAGAATCTGTCTCAGGCT	190 bp
<b>Mcpt2</b>	GAGATTATTGGTGGTGTGAGG	CTCCAAGGATGACACTGATTTC	172 bp
<b>Cpa3</b>	TGGTTTCAAGGATTAAAATTGG	TACATTGAATACAGGCAGAACG	245 bp
<b>c-Kit</b>	ATCACCATCAAAAACGTGAAG	TAAGGAGGTGACTTGTTCAGG	163 bp

#### 2.2.2.11 Glutathion-Peroxidase (Gpx) Enzymaktivität

Als prominente Vertreter der Selenoenzyme reduzieren die Glutathion-Peroxidasen in Abhängigkeit von Glutathion (GSH) vorwiegend Peroxide (R-OOH) zu ihren Alkoholen (a) und vermeiden dadurch eine vermehrte Bildung von ROS. Unter NADPH-Verbrauch wird das oxidierte Glutathion (GS-SG) durch die Glutathion-Reduktase (GR) wiederum zu GSH reduziert (b).



Die Nachstellung dieses Reaktionssystems *in vitro* ermöglicht die Quantifizierung der Gpx-Aktivität in Gewebehomogenaten oder Serum (Flohe und Gunzler, 1984). Stellt man alle Reaktionspartner im Überschuss zur Verfügung, so ist der limitierende Faktor in diesem System die Enzymaktivität. Die zur Enzymaktivität proportionale NADPH-Abnahme lässt sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmen. Es werden 500 µl Reaktionsmix vorgelegt, mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und das zu



untersuchende Probenmaterial (ca. 2 µl murines Serum) hinzugegeben. Zur Messung der Gpx-unabhängigen Hydrolyse von NADPH wurde parallel eine gehemmte Reaktion vorbereitet. Bei diesem Ansatz kamen zu 400 µl Reaktionsmix weitere 100 µl Mercapto-Succinat-Lösung (100 nM). Die Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O sowie die Zugabe des Probenmaterials erfolgten analog zum ersten Reaktionsansatz. Die Reaktion wurde durch 10 µl 0,07% tertiär-Butylhydroperoxid gestartet. In einem Zeitrahmen von drei Minuten und durch sieben Messpunkte wurde die Extinktionsabnahme in Doppelbestimmung erfasst. Das Volumen der Probe wurde so eingestellt, dass innerhalb der Messzeit eine lineare Abnahme von 5-10 % gegeben war.

Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnet sich die Gpx-Aktivität im Probenmaterial durch folgende Formel. Für die exakte Bestimmung muss abschließend noch die Aktivität der gehemmten Probe subtrahiert werden.

$$\text{GPx-Aktivität} = \frac{\Delta E_{340} [\text{min}^{-1}] \times V_{\text{Ansatz}} [\text{l}]}{[\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg})] \quad \epsilon_{340} [\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \times d [\text{cm}] \times m_{\text{Protein}} [\text{mg}]}$$

$\Delta E_{340}$	Extinktionsänderung bei 340 nm [ $\text{min}^{-1}$ ]
$\epsilon_{340}$	molarer Extinktionskoeffizient für NADPH+H <sup>+</sup> ( $\epsilon_{340} \text{ nm}=6200 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )
$V_{\text{Ansatz}}$	Gesamtansatzvolumen (1 ml)
$m_{\text{Protein}}$	Protein pro Ansatz [mg]
$d$	Küvettdurchmesser (1 cm)
Reaktionsmix	0,2 M Tris, 1 mM EDTA, 0,33 mg/ml NADPH, 1,42 mg/ml GSH, 2 U/ml GR, pH 8,0

#### 2.2.2.12 Luminex Multiplex-Immunoassay

Aufgrund der Limitierung des Probenmaterials wurde bei der Bestimmung von Zytokinen im Mausserum auf eine Multiplex-Methode zurückgegriffen. Mit dem auf einem Sandwich-ELISA-basierenden Luminex Multiplex-Immunoassay ist es möglich bis zu 30 Serumfaktoren aus einem geringen Probenvolumen (50 µl) simultan zu erfassen und zu quantifizieren. Im Gegensatz zu einem klassischen Sandwich-ELISA wird hierbei ein Antigen durch zwei verschiedene Antikörper erkannt, von denen einer auf der Festphase (farbkodierte Polymer-Kugeln) immobilisiert ist. Der zweite Antikörper für die Detektion ist biotinyliert und erlaubt die Quantifizierung der Signale und damit der Konzentration des ans Polymer gebundenen Antigens.

Die durchgeführten Arbeitsschritte wurden entsprechend der Herstellerangaben des verwendeten Kits in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Proben wurden zusammen mit einem Gemisch aus Polymer-Kügelchen über Nacht zum Binden der Antigene in einer Mikrotiterfilterplatte inkubiert. Durch mehrmalige Zugabe von Waschpuffer und Absaugen der Filterplatte wurde dieses Gemisch gewaschen. Als nächster Schritt folgte die Zugabe der biotinylierten Detektionsantikörper und eine weitere Inkubation mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex. Nach den finalen Waschschritten wurde die Konzentration im Luminex 200 bestimmt. Dabei werden die Kügelchen einzeln durch eine Kapillare geführt und die Farbkodierung (Analytenzuordnung) sowie die Stärke des Fluoreszenzsignals (Analytenkonzentration) erfasst. Messungen werden als erfolgreich gewertet, wenn mindestens 50 Polymer-Kügelchen je Analyt identifiziert und quantifiziert sind.

### 2.2.3 Histologische Methoden

#### 2.2.3.1 *Einbetten von Därmen*

Für histologische Untersuchungen des Intestinaltraktes wurde der dritte Abschnitt des Dünndarms ausgewählt. Die Unterbringung der fixierten und Methylenblau-vorgefärbten Darmsegmente in den Einbettkassetten erfolgte durch Einrollen („Swiss Roll“) der Därme. Die Zotten-tragende Seite wird hierbei nach innen gewendet (Park et al., 1987). Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Kassetten in PBS und bei 4°C gelagert. Die Entwässerung und das Einbetten der Gewebepräparate erfolgten am Institut für Pathologie der Charité (Campus Mitte) mit freundlicher Unterstützung von Frau Gabriele Fernahl. Fertige Paraffinblöcke lagerten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

#### 2.2.3.2 *Anfertigen von Paraffinschnitten*

Aus den in Paraffin eingebetteten und fixierten Gewebepräparaten wurden 2 µm dicke Schnitte mit einem Rotationsmikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt. Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger überführt. Durch das Trocknen der Schnitte im Trockenschrank (37°C, ü.N.) war eine weitere Lagerung bei RT möglich.

### 2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung ist eine etablierte und verbreite Methode und dient als Übersichtsfärbung der morphologischen Begutachtung von Gewebeschnitten. Basophile Kompartimente (z.B. Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum) werden blau und eosinophile Kompartimente (Zellplasma) werden rot angefärbt. In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Gewebeschnitte über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

Die Schnitte wurden mit Hämatoxylinlösung gefärbt (5 min) und unter warmem Leitungswasser gebläut (3 min). Nach dem Abspülen mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte analog die Färbung mit Eosin. Abschließend wurden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan® Neu (Merck, Darmstadt) eingedeckt und getrocknet.

absteigende Alkoholreihe		aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	2 x 10 min	EtOH (96%)	2 x 1 min
EtOH (100%)	2 x 5 min	EtOH (100%)	2 x 1 min
EtOH (96%)	2 x 3 min	Xylol	2 x 1 min
EtOH (70%)	1 min		
EtOH (40%)	1 min		
<hr/>			
Hämatoxylinlösung:	0,2% (w/v) Mayer's Hämatoxylin (Chroma, Münster), 6,25% (w/v) Kalialaun, 6,25% (w/v) Chloralhydrat, 0,125% (w/v) Zitronensäure, kristallin, 0,025% (w/v) Natriumjodat NaIO <sub>3</sub>		
Eosinlösung:	1,25% (w/v) Eosin Yellowish (Chroma, Münster), 70% (v/v) EtOH, direkt vor Gebrauch 4% (v/v) Eisessig		

### 2.2.3.4 Chloracetatesterase-Färbung

Zur Identifizierung und Sichtbarmachung von Gewebsmastzellen und neutrophilen Granulozyten ist die Chloracetatesterase-Färbung eine etablierte histologische Färbemethode (Leder, 1970). Die Sichtbarmachung der Esteraseaktivität erfolgt durch das Diazoniumsalz Pararosanilin und dem als Substrat dienenden Naphthol AS-D Chloracetat. Na-Nitritlösung und Pararosanilinlösung werden hierzu in gleichen Volumenanteilen gemischt (je 300 µl) und inkubiert (60 sek). Zu diesem Ansatz wurde Phosphatpuffer (90 ml) gegeben und auf einen pH-Wert von 6,3 eingestellt. Frisch angesetzte und filtrierte Substratlösung (5 ml) wurde zugesetzt und mit der resultierenden Färbelösung wurden die entparaffinierten Schnitte gefärbt (RT, 30 min). Es folgten vier Waschschrte (je 5 min) mit ddH<sub>2</sub>O, eine Kernfärbung mit Toluidinblau und weitere vier Waschschrte. Das Dehydrieren und Eindecken der Schnitte wurde wie bereits für die HE-Färbung beschrieben durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl an Mastzellen dienten humane Hautschnitte als Positivkontrollen.

Pararosanilin-Lösung (4%)	0,4 g Pararosanilin in 8,4 ml ddH <sub>2</sub> O + 1,6 ml 2 N HCl
Na-Nitritlösung (4%)	4% (w/v) Na-Nitrit in ddH <sub>2</sub> O
Phosphatpuffer 0,07 M	A: 0,946 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei) /100 ml B: 1,045 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /100 ml 30 ml A + 70 ml B => pH 6,5
Substrat-Lösung	0,03 g Naphthol AS-D Chloracetat, 3 ml NN-dimethylformamid
Toluidinblau-Stock-Lösung	0,5 g Toluidine blue O Sigma, 50 ml 70% EtOH
NaCl-Lösung(1%)	1% (w/v) NaCl in H <sub>2</sub> O bidest., pH 2,2 mit HCl einstellen
Toluidinblau-Färbelösung:	10% Toluidinblau-Stock-Lösung + 90% NaCl-Lösung, 1%-ig

### 2.2.3.5 Immunhistologie

Immunhistologisch erfolgte der Nachweis von Gewebsmastzellen über einen fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -CD117-Antikörper (c-Kit, eBioscience, San Diego, USA). Die Schnitte wurden entparaffiniert und die Antigen-Demaskierung mit Citratpuffer (DAKO, pH 6,0) erfolgte durch Erhitzen in einer Mikrowelle (450 Watt, 2 x 5 min). Die Schnitte wurden mit PBST vorinkubiert (15 min). Anschließend folgten drei Waschschrte mit PBSG und unspezifische Bindestellen wurden durch 1,5% NGS (Vectastain® ABC-Kit, Vector Laboratories, USA) blockiert. Mit dem FITC-markierten CD117-Antikörper (1:25 in PBS) wurde ü.N. inkubiert. Nachdem abermals mit PBSG gewaschen wurde, folgte eine DAPI-Kernfärbung (1:30000 in PBS, 1 min). Nach den abschließenden Waschschrten wurden die Schnitte mit ImmuMount (Shandon, USA) eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C und in Dunkelheit gelagert.

10 x PBS:	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 L ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4
PBST:	0,5% (w/v) Triton X100 in 1 x PBS
PBSG:	0,1 M Glycin in 1 x PBS
PBS/HS:	10% Horse Serum in 1 x PBS
PBS/NaCl:	0,25 M NaCl in 0,01 M PBS

### 2.2.4 Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik (TRFA)

Die TRFA bietet die Möglichkeit der simultanen Multielementanalytik unter einem geringen Verbrauch von Probenmaterial, im Vergleich zu ähnlich sensitiven Verfahren. So ist die Bestimmung z.B. der Serum-Selenkonzentration bei Mäusen schon mit einem Probenvolumen von 15  $\mu$ l als Duplikat möglich (Stosnach et al., 2008). Gleichzeitig ermöglicht sie eine effektive Überwachung der Selensupplementation in den unterschiedlichen Fütterungsgruppen. Im Gegensatz zur Röntgenfluoreszenzanalyse erfolgt

die Einstrahlung des anregenden Röntgenstrahls in einem extrem flachen Winkel und ermöglicht durch die auftretende Totalreflexion ein minimales Signal-Rausch-Verhältnis bei dünnsschichtigen Proben. Die entsprechend des Energieniveaus emittierte Fluoreszenzstrahlung ist charakteristisch für die einzelnen Elemente (Wellenlänge) und proportional zur Konzentration (Peakfläche). Zur Quantifizierung wird ein interner Monoelement-Standard benötigt und der Probe vor der Messung in definierter Konzentration zugegeben. Für die untersuchten biologischen Proben wurde hierfür das Element Gallium (Ga) verwendet (TraceCERT®, Fluka). Alle Messungen wurden mit dem S2 Picofox (Bruker, Berlin) durchgeführt und anhand der mitgelieferten Software ausgewertet.

#### 2.2.4.1 Serum

Für die Bestimmung der Selenkonzentration in Serumproben der Versuchstiere war kein gesonderter Probenaufschluss notwendig. Serum wurde 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und Gallium als interner Standard in einer Konzentration von 1 mg/L zugefügt. Dann wurden 8 µl dieser Verdünnung auf einen Quarzglas-Objektträger aufgebracht und bei RT bis zur vollständigen Trocknung inkubiert. Alle Messungen erfolgten als Duplikate. Gesamtprobenbedarf somit nur 7 µl Serum.

Zur Bestimmung des Protein-gebundenen Selens wurde Fällung mit Trichloressigsäure (TCA, 10%) durchgeführt. Hierzu wurde das Serum in gleichem Volumen mit der TCA-Lösung vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde abzentrifugiert (5 min, 14.0000 rpm) und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde zweimal mit eiskaltem EtOH (absolut) gewaschen und anschließend bei RT vollständig getrocknet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Pellet entsprechend des Eingangsvolumens in 65%-iger HNO<sub>3</sub> (Ga 1mg/L) resuspendiert.

#### 2.2.4.2 Gewebe

Für die Bestimmung der Selenkonzentrationen im Gewebe erfolgte als erster Schritt die genaue Einwaage des Probenmaterials in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße. Je mg Gewebematerial wurden 2 µl 65% HNO<sub>3</sub> (Ga 1mg/L) zugegeben und anschließend im Thermoschüttler inkubiert (60 °C, 45 min). Die Quarzglas-Objektträger wurden für ein besseres Anhaften der Proben mit einer Silikonlösung (Serva) beschichtet (2-4 µl). Trocknen und Messen der Probe erfolgte wie bereits vorab beschrieben (s. 2.2.4.2).

#### 2.2.4.3 Nagerdiäten

Futterproben wurden erst grob mechanisch zerkleinert, dann feingemörsert und in Mengen von 30-50 mg in Glasröhrchen überführt. Zum Aufschluss wurde 65%  $\text{HNO}_3$  (4  $\mu\text{l}/\text{mg}$ ) zugefügt und unter Verwendung von Siedesteinen im Heizblock inkubiert (150 °C, 1 h). Die Objektträger wurden mit Silikon beschichtet und nach dem Auftrag der Probe bei RT getrocknet und dann gemessen.

#### 2.2.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde die Software SPSS Statistics 19 (IBM, Deutschland) verwendet. Alle Daten wurden auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) getestet und mit den im Einzelnen angegebenen Tests auf Unterschiede in den Grundgesamtheiten überprüft. Die Fehlerbalken zeigen, soweit nicht gesondert als Standardabweichung (SD) ausgewiesen, den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die graphische Darstellung der Signifikanzschwellen ist einheitlich nach folgenden Schema gewählt: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

### 3 Ergebnisse

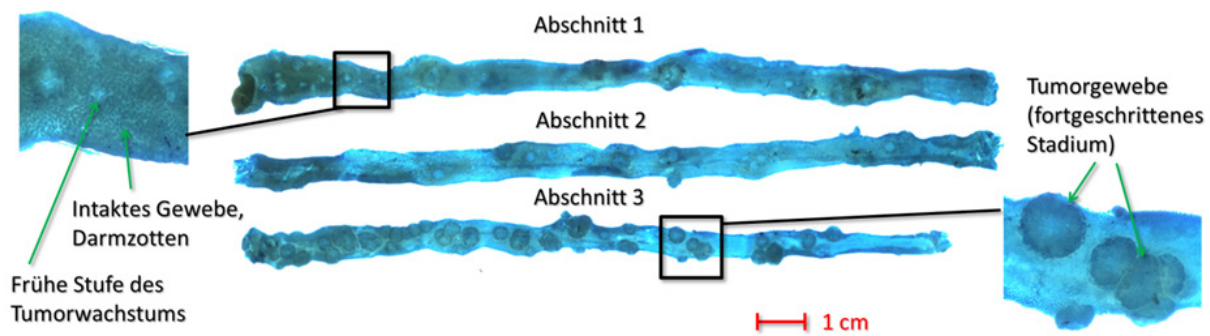
Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden innerhalb eines von der Deutschen Krebshilfe geförderten Projektes (Projekt: 10-1792-Scho II) und in Teilen in Zusammenarbeit mit Dipl. Biologe Tobias Endermann erarbeitet. Der thematische Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung von Effekten bedingt durch eine genetische Intervention der SepP-Expression. Diätetische Effekte werden zusammenfassend beschrieben.

#### 3.1 *SepP*-Genotyp und Tumorigenese

##### 3.1.1 Tumorgroße und Verteilung

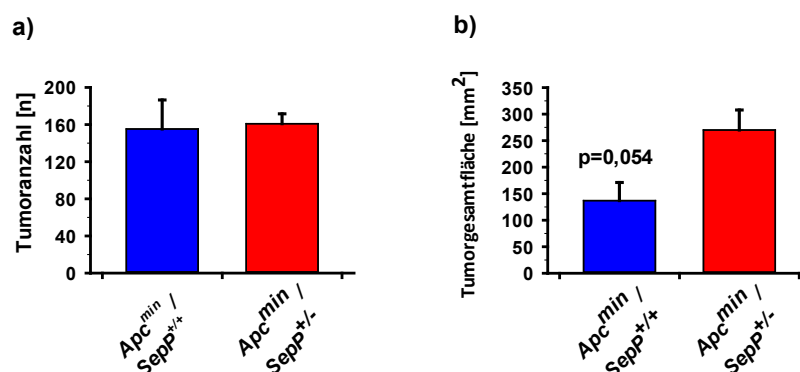
###### 3.1.1.1 *Adäquate Selenversorgung (0,15 ppm Se)*

Zur Beurteilung der Parameter Tumorgroße und -verteilung wurde der Intestinaltrakt 120 Tage alter Mäuse fixiert, um das Gewebe in seiner Struktur zu erhalten. Aufgrund schlechter Kontrastverhältnisse, die die Abgrenzung von Tumoren und Normalgewebe erschweren, erfolgte eine Färbung mit Methylenblau, welche auch bei koloskopischen Untersuchungen in der humanen Diagnostik Anwendung findet. Entsprechend des Versuchsprotokolls wurden die Versuchstiere ab Tag P21 auf definiertem Futter mit einem Selengehalt von 0,15 ppm Se gehalten. Die Ergebnisse der mikroskopischen Tumoranalyse für die einzelnen Abschnitte des Dün- (DüDa 1-3) sowie Dickdarms (DiDa) wurden von zwei Personen unabhängig ermittelt (vgl. Abb. 11). Gegenübergestellt sind im Folgenden die Ergebnisse zum Einen von  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ -Tieren und zum Anderen von  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren, als Modell zur Untersuchung des Stellenwertes der genetischen Prädisposition und den damit einhergehenden Defiziten in der plasmatischen Selenversorgung. Zu Beginn erfolgte die systematische Auswertung über den gesamten Intestinaltrakt.



**Abbildung 11: Die  $Apc^{min}$ -Maus als Modell der intestinalen Tumorigenese.** Abgebildet sind die einzelnen Abschnitte des Dünndarms von proximal bis distal einer  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Maus. Vor allem der dritte Abschnitt zeigt eine ausgeprägte Tumorigenese mit deutlich fortgeschrittenen Adenomen.

Betrachtet man die Gesamtanzahl der vorliegenden Tumore über die gesamte Darmfläche, so zeigt sich kein relevanter Unterschied zwischen den  $SepP$ -Genotypen (Abb. 12 a). Unter der Annahme einer nahezu kreisförmigen Gestalt der Tumore und mittels der gemessenen Tumordurchmesser wurde die Gesamtumorfläche berechnet. Interessanterweise zeigt die Auswertung der Flächenberechnung bei  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren eine bis zu 50% erhöhte Gesamtumorfläche im Vergleich zu  $Apc^{min}$  Kontrolltieren (Abb. 12 b).

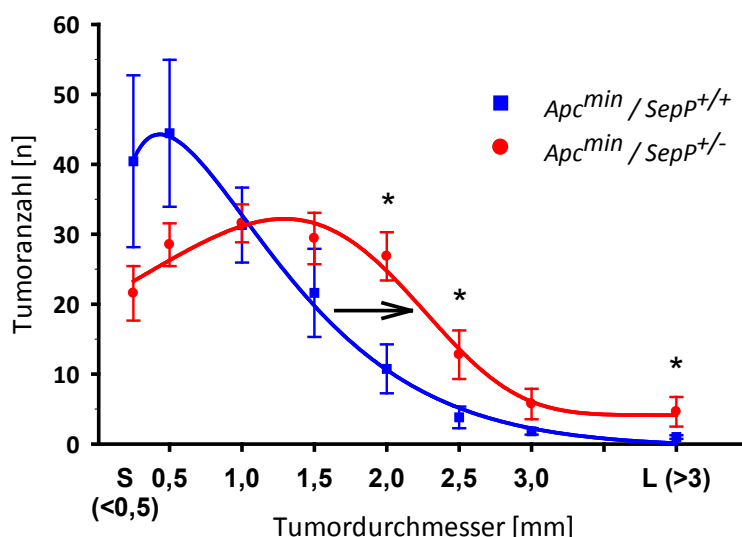


**Abbildung 12: Tumoranzahl und Fläche über den gesamten Intestinaltrakt von  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ - und  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ -Tieren auf RDA-Diät.** Dargestellt sind die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore im Intestinaltrakt (MW  $\pm$  SEM, Mann-Whitney-U-Test, n = 8-9). Während sich die Tumoranzahl unverändert zeigt, ist die Gesamtfläche in den heterozygoten Tieren deutlich erhöht.

Eine Aufteilung in die entsprechenden Größenkategorien ermöglichte eine differenziertere Analyse des vorliegenden Effektes. Im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt es in  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren zu einer Reduktion von der Tumoranzahl bis zu einem Durchmesser von 1 mm. Ist diese Größenordnung jedoch überschritten, zeigt sich ein inverser Effekt auf die Tumoranzahl, und  $SepP^{+/-}$ -Tiere zeigen deutlich mehr größere Tumore (Abb. 13). Für bestimmte Durchmesser ist diese Verschiebung hin zur Ausbildung größerer Tumore



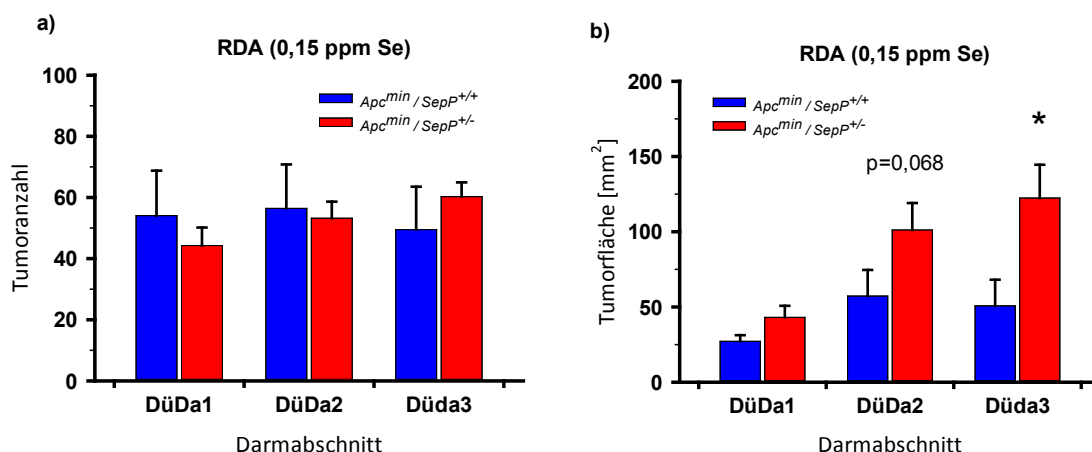
signifikant (2 mm; 2,5 mm; < 3 mm). Durch den Verlust eines Allels des zentralen Transport- und Speicherproteins für Selen kam es somit zur Entstehung größerer Tumore über den gesamten Darmtrakt, jedoch ohne die Gesamtumorlast (in Bezug auf tumoröser Darmoberfläche) zu erhöhen.



**Abbildung 13: Tumorverteilung über den gesamten Intestinaltrakt in  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$  und  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$  Tieren auf RDA-Diät (0,15 ppm Se).** Dargestellt ist die Tumoranzahl in den verschiedenen Größenkategorien (MW  $\pm$  SEM). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede in den Größenkategorien zwischen den einzelnen Genotypen (Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ ,  $n = 8 - 9$ ). Neben einer Verringerung der Anzahl der Tumore in den kleineren Größenkategorien (< 0,5 und 0,5 mm Durchmesser) nimmt die Anzahl größerer Tumore in den heterozygoten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu. Die graphische Darstellung zeigt eine Verschiebung der Tumorverteilung hin zu großflächigeren Tumoren bei SepP heterozygoten Tieren. Zur Verdeutlichung der Unterschiede in den Verteilungsmustern sind diese näherungsweise durch polynomische Interpolationslinien und mit einem Richtungspfeil hervorgehoben.

Um herauszufinden, ob sich diese Effekte nur auf bestimmte Darmabschnitte beschränken oder sich durch den ganzen Gastrointestinaltrakt (GIT) erstrecken, wurden die entsprechenden Analysen unter Berücksichtigung der Lokalisation in den drei präparierten Dünndarmsegmenten getrennt durchgeführt. Die Gesamtanzahl der Tumore war über die einzelnen Abschnitte in der Kontrollgruppe ( $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ ) relativ konstant. Bei den heterozygoten Tieren kam es zu einer stufenweisen Erhöhung der Tumoranzahl in Richtung der distalen Dünndarmsegmente (Abb. 14 a). Deutlicher wird dieser Effekt, wenn die Verteilung der Tumorflächen betrachtet wird. Im Vergleich zum proximalen Teil lag im medialen und distalen Abschnitt eine signifikant ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) größere Gesamtumorfläche in  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren vor. Für die

Kontrollgruppe war keine Zunahme nachweisbar. Im Vergleich beider Versuchsgruppen trat der negative Einfluss einer genetischen Prädisposition auf die Tumorfläche verstärkt und signifikant ( $p < 0,05$ ) im distalen Bereich des Dünndarms in Erscheinung (Abb. 14 b). Die verminderte *SepP*-Expression stellt somit im vorliegenden Tiermodell einen Risikofaktor für eine verstärkte Tumorigenese dar.



**Abbildung 14: Tumoranzenzahl sowie -fläche in den verschiedenen Abschnitten des Dünndarms von *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/+</sup>* und *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>* Tieren auf RDA-Diät.** Dargestellt ist die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore in den drei einzeln untersuchten Dünndarmabschnitten (DüDa 1-3; MW  $\pm$  SEM). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede der Tumoranzenzahl im Vergleich der einzelnen Genotypen (Mann-Whitney-U-Test, \*\* =  $p < 0,01$ , \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 8-9$ ). In den heterozygoten Tieren tritt eine tendenzielle Erhöhung der Tumoranzenzahl in Richtung des distalen Darmsegmentes auf. Entsprechend dieser Tendenz ist die Tumorfläche im Vergleich zum proximalen Segment in den anderen Segmenten signifikant erhöht. Heterozygote Tiere weisen im dritten Darmabschnitt eine signifikant höhere Tumorfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

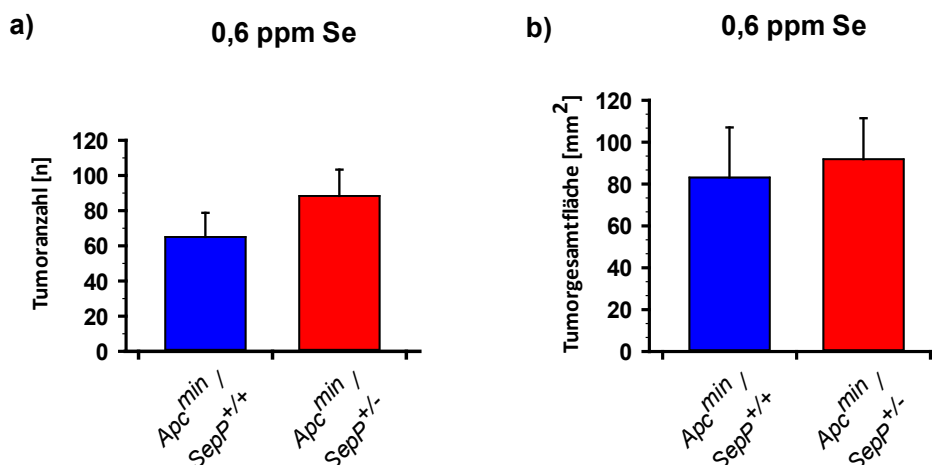
Um geschlechtsspezifische Auswirkungen auf die untersuchten Parameter zu detektieren, wurden sämtliche Parameter zusätzlich getrennt für Männchen und Weibchen ausgewertet. Ein Einfluss des Geschlechts auf Tumorgöße oder Tumoranzenzahl konnte bei diesen Analysen nicht festgestellt werden.

### 3.1.1.2 Erhöhte Selensupplementation (0,6 ppm Se)

Aufgrund der Erweiterung des Versuchsansatzes mit einer Se-Supplementation war es möglich, den Genotyp-bedingten Effekt auf die Tumorigenese zusätzlich unter den Bedingungen einer verbesserten Se-Versorgung (0,6 ppm Se ab Tag P21) zu untersuchen.

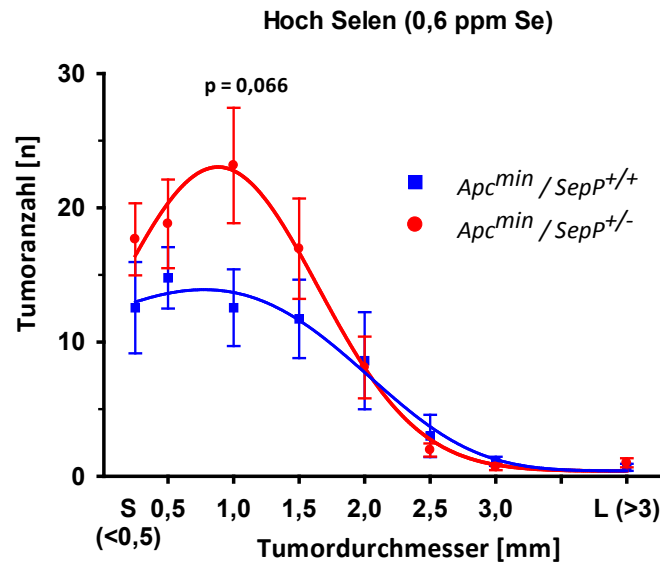
Hierbei zeigten sich die Tumoranzenzahl sowie die Ergebnisse der Tumorflächenberechnung für den gesamten Darmtrakt um ca. 20% höher bei den heterozygoten als den Kontroll-Mäusen,

jedoch ohne signifikante Unterschiede aufzuweisen (Abb. 15 a+b). Im Gegensatz zur adäquaten Selenversorgung ist somit nicht nur singular die Tumorgroße vom *SepP*-Genotyp beeinflusst, sondern zusätzlich die Tumoranzahl.



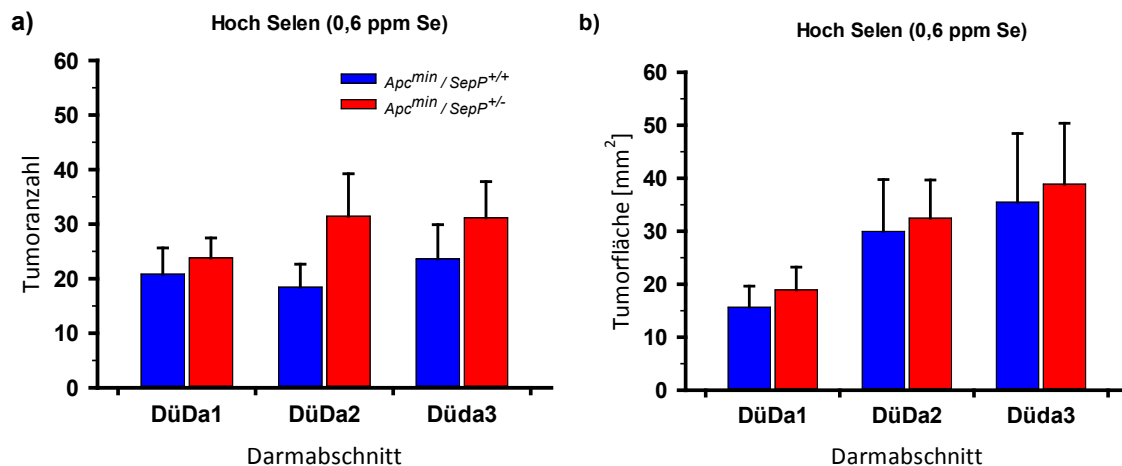
**Abbildung 15: Tumoranzahl und Fläche über den gesamten Intestinaltrakt von *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/+</sup>* und *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>*-Tieren auf Hoch-Selen-Diät (0,6 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore im Intestinaltrakt (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test; n =9-10). Tumoranzahl und Fläche sind bei *SepP<sup>+/-</sup>*-Tieren um bis zu 20% höher als bei den Kontrolltieren.

Die Auftragung der Anzahl gegen die Größe ergab eine erhöhte Tumorbilastung des Intestinaltraktes für die Durchmesser Kategorien bis einschließlich 1,5 mm (Abb. 16). Die stärkste Ausprägung der erhöhten Tumorbilast zeigt sich für einen Durchmesser von 1 mm und liegt auf nahezu signifikantem Niveau ( $p = 0,066$ ). Das Phänomen der Verschiebung des Tumorspektrums hin zu größeren Tumoren in *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>*-Tieren lag bei erhöhter Selenversorgung nicht vor.



**Abbildung 16:** Tumorverteilung über den gesamten Intestinaltrakt in  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$  und  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren auf Hoch-Selen-Diät (0,6 ppm Se). Dargestellt ist die Gesamtumoranzahl relativ zum Durchmesser (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test, n = 9-10).  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tiere entwickeln im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt Tumore bis zu einem Durchmesser von 1,5 mm.

Die medialen und distalen Darmsegmente zeigten auch in diesen Fütterungsgruppen die größte Effektspanne. Beiden konnte eine erhöhte Tumorlast (Anzahl, Fläche) in  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren zugeschrieben werden. Im Abschnitt Düda2 waren die deutlichsten Unterschiede zu finden, mit einer um bis zu 40% erhöhten Gesamtumoranzahl (Abb. 17 a). Die resultierende Gesamtfläche ergab eine Vergrößerung um den Faktor 1,4 (Abb. 17 b). Der proximale Abschnitt beider Versuchsgruppen ist durch den genetischen Unterschied nur wenig betroffen. Die Werte für beide untersuchten Parameter liegen in einem vergleichbaren Bereich und unterliegen geringen interindividuellen Schwankungen.



**Abbildung 17: Tumoranzahl und Fläche in verschiedenen Abschnitten des Dünndarms von  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ - und  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren auf Hoch-Selen Diät.** Dargestellt sind die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore in den drei einzelnen untersuchten Dünndarmabschnitten (DüDa 1-3; MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test; n = 9-10). In allen Darmabschnitten sind die Anzahl und Gesamtfläche der Tumore von  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren erhöht.

Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurde weitergehend für alle Darmabschnitte der Anteil der entsprechenden Größenkategorien am Gesamteffekt untersucht. Die Tumoranzahl und Tumorfächenverteilungen im medialen und distalen Abschnitt (DüDa 2-3) zeigten signifikante Veränderungen und ist in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte das Fehlen eines Allels zur vermehrten Ausbildung von Tumoren kleinerer Durchmesser im distalen Bereich des Darmtraktes auf der Hoch-Selen Diät.

**Tabelle 10: Zusammenfassende Darstellung der statistischen Auswertung von Tumoranzahl (a) und Tumorfäche (b) in den einzelnen Darmabschnitten von  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ - und  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren auf Hoch-Selen Diät unter Berücksichtigung der Größenkategorie.** Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede in der Tumoranzahl bzw. -fläche im Vergleich der beiden Genotypen (Mann-Whitney-U-Test, \*\* = p < 0,01; \* = p < 0,05; n = 9-10).

a)	DüDa1	DüDa2	DüDa3	DiDa	Gesamt
S					
0,5		p=0,065			
1		*	**		p=0,066
1,5					
2					
2,5					
3					
L					

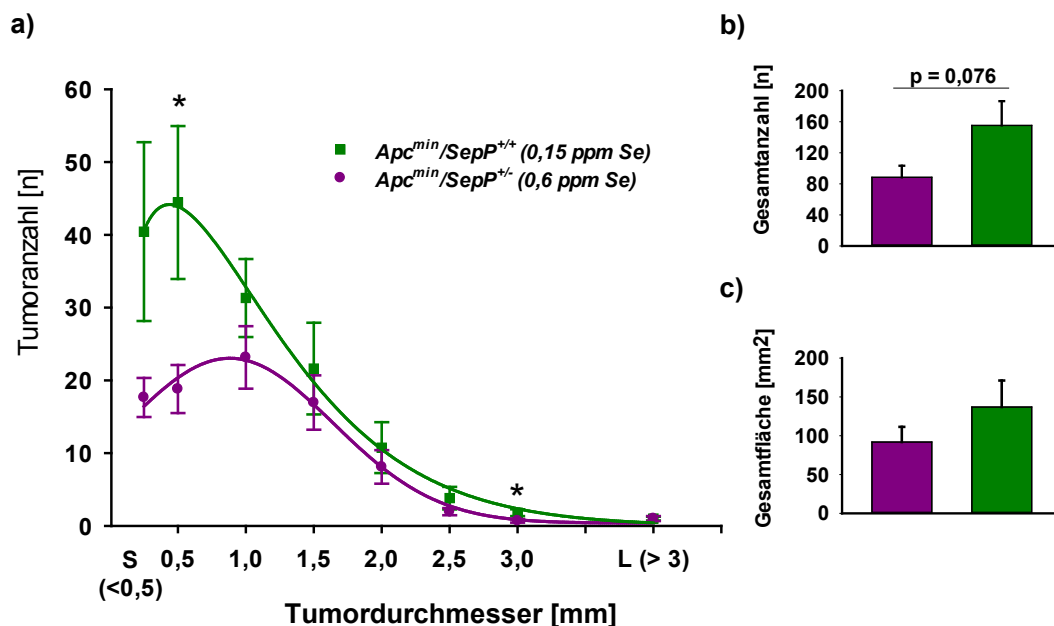
b)	DüDa1	DüDa2	DüDa3	DiDa	Gesamt
S					
0,5		p=0,060			
1		*	**		p=0,066
1,5					
2					
2,5					
3					
L					

Das verwendete Versuchsdesign diente zusätzlich der Beantwortung der Fragestellung, ob eine Supplementation mit Selen einen vorliegenden unvorteilhaften Genotyp positiv beeinflussen kann.

Ein erhöhtes diätetisches Angebot von Selen wirkte sich unabhängig vom vorliegenden Genotyp durchweg positiv auf die Tumorigenese aus (Details mit Abbildungen zu diesen Ergebnissen finden sich in der Dissertation von Dipl. Biol. Tobias Endermann (Endermann, eingereicht 2012)).

Die gesamte Tumoranzahl sowie Tumorfläche waren bei intakter Selenoprotein-Expression ( $SepP^{+/+}$ ) nach Se-Supplementation verringert (auf 40% bzw. 60%;  $p < 0,05$  bzw. n.s.). Auch bei gestörter *SepP*-Expression ergaben sich überzeugende Resultate durch eine gesteigerte Selenversorgung auf die Ausprägung der untersuchten Parameter (Anzahl und Fläche: Reduktion um 55% bzw. 35%;  $p < 0,001$ ). Die Auftragung von Tumorgröße gegen die entsprechende Tumoranzahl machte deutlich, dass es für beide Genotypen zu einer verminderten Ausbildung von Tumoren aller Größenkategorien ( $SepP^{+/-}$ ) beziehungsweise der Tumore bis zu einem Durchmesser von 2 mm ( $SepP^{+/+}$ ) kam.

Darüber hinaus vermag eine erhöhte Selengabe nicht nur die negativen Einflüsse eines *SepP*-Allelverlustes auszugleichen, sondern führte auch zu einer erhöht anti-kanzerogenen Wirkung. Die nachteilige genetische Prädisposition der  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tiere konnte durch eine Hoch-Selen Diät nicht nur ausgeglichen werden, diese so gefütterten Tiere zeigten sogar geringere Tumoranzahlen und -flächen als  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ -Tiere auf adäquater Selenversorgung (Abb. 18 a-c).

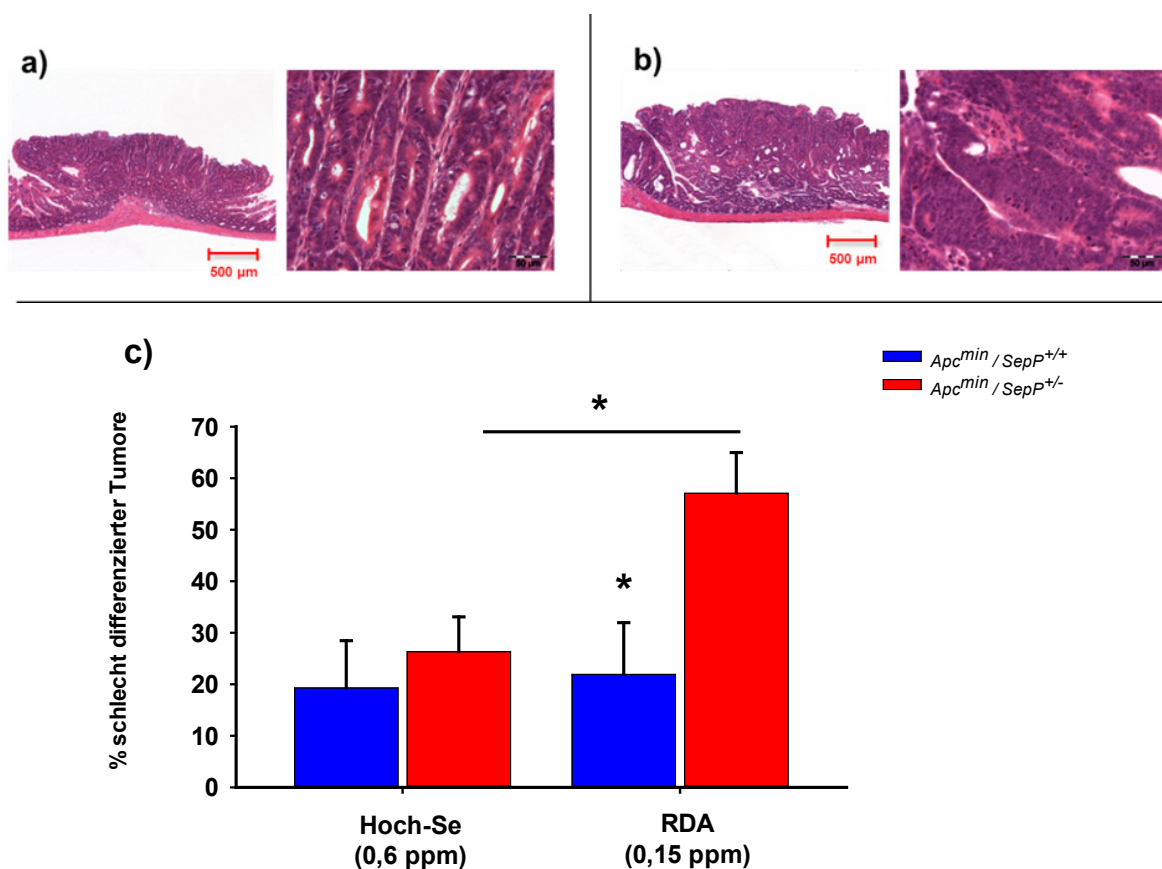


**Abbildung 18: Tumorverteilung über den gesamten Intestinaltrakt in  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ -Tieren auf RDA Diät (0,15 ppm Se) im Vergleich zu  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren bei diätetischer Intervention mit einer Hoch-Selen-Diät (0,6 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamtumoranzahl relativ zum Durchmesser (a) sowie die Gesamtanzahl und – fläche über alle Größenkategorien (b+c) (MW  $\pm$ SEM). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede der Tumoranzahl zwischen den einzelnen Genotypen (Mann-Whitney-U-Test,  $n = 8-10$ ). Die gesteigerte Selen-supplementation führte zu einer Aufhebung tumorfördernden Genotyp-bedingten Effektes (vgl. Abb. 13) und resultierte in einer verringerten Tumoranzahl und Fläche, die signifikant für einzelne Durchmesser-kategorien waren.

### 3.1.2 Tumor-Grading

Neben Anzahl und Größe ist der Grad der Entartung von Tumoren von entscheidender Bedeutung für die Prognose bei Krebserkrankungen. Klassischerweise wird die Beurteilung von Tumoren in der Medizin anhand eines einheitlichen Schemas eingeteilt. Die UICC (*Union for International Cancer Control*) trennt fünf verschiedene Grade (G1, G2, G3, G4 und G9) mit zunehmend schlechterer Differenzierung voneinander ab. Diese reichen von einer guten Differenzierung des bösartigen Gewebes, mit hoher Übereinstimmung zum Ursprungsgewebe (low grade) bis hin zu undifferenziertem Gewebe, welches teilweise keinem bestimmten Ausgangsgewebe mehr zugeordnet werden kann (high grade). Ausgebildete exophytische Tumore von  $Apc^{min}$ -Tieren erreichen nur in seltenen Fällen das Stadium invasiver Karzinome, bei dem es zum Durchbrechen der Basalmembran kommt. Bei der Beurteilung der histologischen Präparate wurden die vorliegenden Tumore deshalb in nur zwei Kategorien eingeteilt (gut differenziert, schlecht differenziert) (Abb. 19). Aufgrund der fehlenden Expertise auf diesem Gebiet wurden diese erfahrungsabhängigen Analysen durch Prof. Dr. Wilko Weichert (Allgemeine Pathologie, Universitätsklinik, Heidelberg) ausgewertet.

Durch den Verlust eines Allels wiesen Tiere bei adäquater Selenversorgung einen deutlich höheren Anteil im Vergleich zu Kontrolltieren (2,7-fach;  $p < 0,05$ ) an schlecht differenzierten Tumoren auf. Durch die Erhöhung der Selenversorgung (0,6 ppm Se) verschob sich in beiden Genotypen das Verhältnis hin zu einem besseren Differenzierungsgrad und es lagen keine Genotyp-bedingten Unterschiede mehr vor (Abb. 19 c). Bei verminderter SepP-Expression war unter adäquater Selengabe somit die Ausbildung schlechter differenzierter Tumore erhöht, und eine vermehrte präventive orale Selenzufuhr war in der Lage, diesen Effekt aufzuheben.

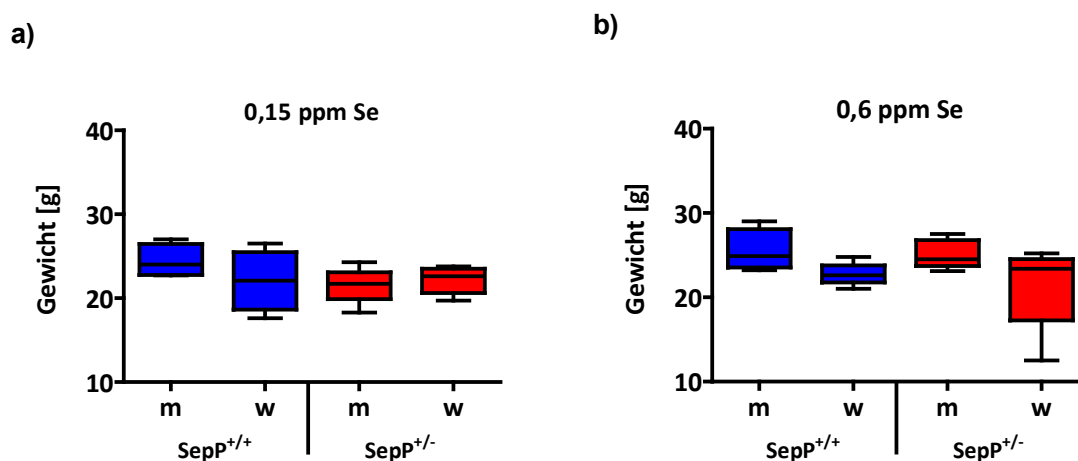


**Abbildung 19: Grad der Tumordifferenzierung in  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ - und  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren.** Der oberen Teil der Abbildung zeigt exemplarisch zwei Tumore mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad (a = gut differenziert; b = schlecht differenziert (Michaelis, 2008)). In (c) ist der prozentuale Anteil schlecht differenzierter Tumore zur Gesamtumoranzahl der histologischen Präparate dargestellt (MW  $\pm$  SEM). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test,  $n = 6-9$ ). Eine adäquate Selenversorgung führt zur Ausbildung schlechter differenzierter Adenome bei heterozygoten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren bzw. im Vergleich zu einer supplementierten Selenzufuhr.



### 3.1.3 Körpergewicht

Im Verlauf von Krebserkrankungen kommt es mitunter zum Auftreten von Auszehrungs- und Abmagerungserscheinungen, die auch als Tumorkachexie bezeichnet werden. Die Gewichtskontrolle aller Versuchstiere zeigte stabile und konstante Werte für das Körpergewicht innerhalb der Größenordnungen gesunder Tiere. Entsprechend der erwarteten geschlechtsspezifischen Unterschiede waren die Werte für die weiblichen Versuchstiere niedriger als bei den Männchen. Versuchsbedingt wiesen nur die heterozygoten Versuchstiere bei adäquater Selenversorgung ein tendenziell vermindertes Gewicht auf. Diese Effekte zeigten sich jedoch nicht signifikant (Abb. 20 a+b).

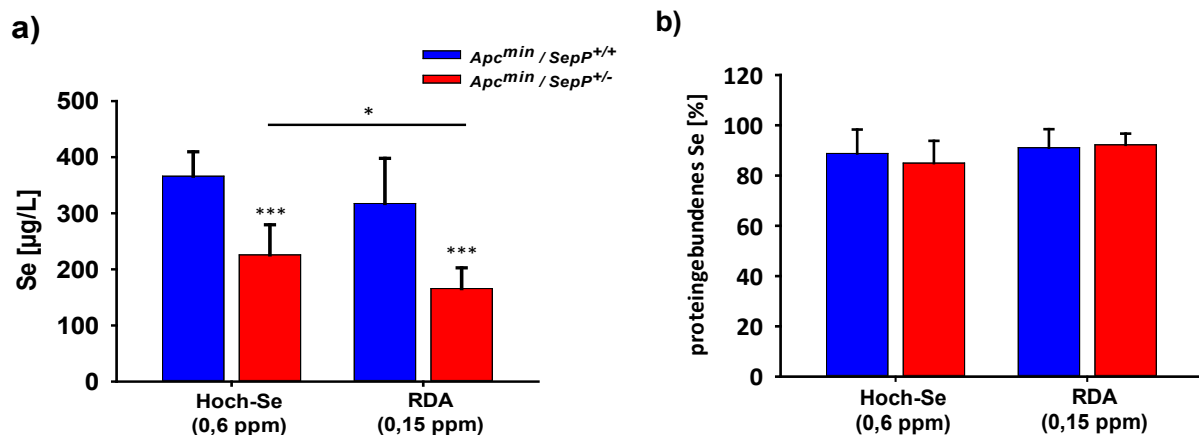


**Abbildung 20: Körpergewicht der Versuchstiere bei adäquater (0,15 ppm (a)) und erhöhter Selenversorgung (0,6 ppm (b)) (P120).** Dargestellt sind die Gewichte als Mittelwerte  $\pm$  SD (T-Test;  $n = 4-6$ ). Versuchsbedingt zeigten die Tiere keine Symptome einer Kachexie.

### 3.1.4 Selenkonzentrationen

Die Selenspiegel im Serum der Mäuse wurden zum Versuchsende (120 Tage) bestimmt. Der Allelverlust führte zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0,001$ ) des Serum-Selengehaltes. Für beide Fütterungsstrategien lag dieser bei nur noch 55-60% im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Bei adäquater Selenversorgung lag der Selenspiegel im Mittel bei ca. 317  $\mu\text{g/L}$  bzw. bei 166  $\mu\text{g/L}$  Se im heterozygoten Tier. Eine erhöhte Selensupplementation resultierte in einem leichten Anstieg des Serumspiegels bei beiden Genotypen. Bei genetisch bedingter verminderter *SepP*-Expression war diese Steigerung signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 21 a). Die geringen futterbedingten Effekte bei Wildtyp-Tieren durch eine erhöhte Selengabe lassen auf

das Vorhandensein eines Plateaus für die Konzentrationen im plasmatischen Selenpool schließen.



**Abbildung 21: Serum-Selengehalte in *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/+</sup>*- und *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>*-Tieren bei adäquater (0,15 ppm) und erhöhter Selenversorgung (0,6 ppm).** Dargestellt sind die Konzentrationen als Mittelwerte  $\pm$  SD. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (T-Test; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 8-9$ ). Die Selenkonzentrationen heterozygoter Tiere sind sowohl beim Vergleich der Genotypen als auch der Futtergruppen verringert.

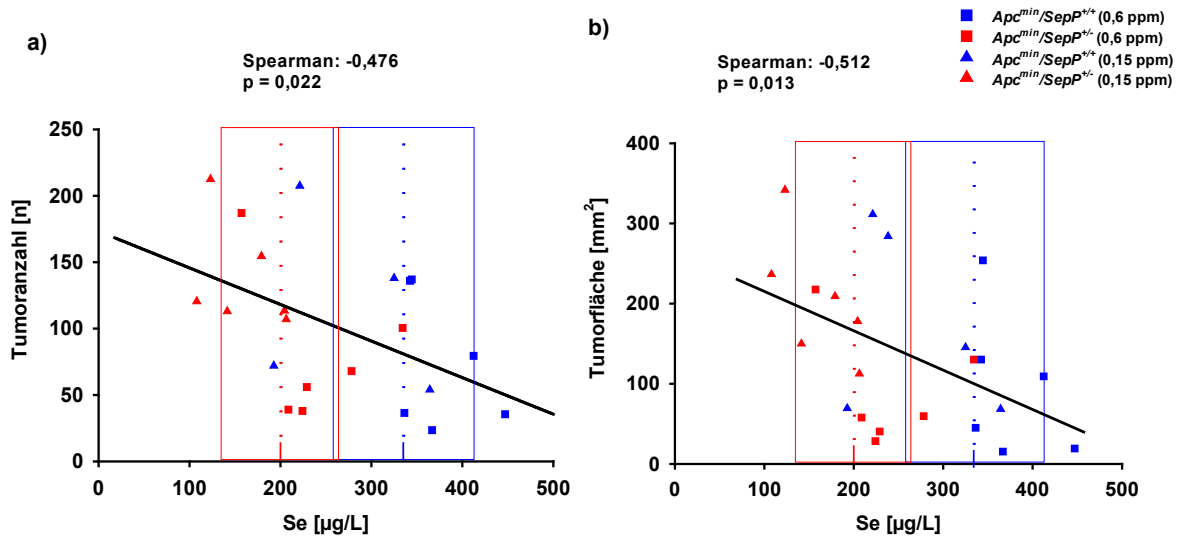
Mittels Proteinfällung der Serumproben durch TCA (Trichloressigsäure) konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass der überwiegende Teil des Selens (90-95%) im Serum proteingebunden vorliegt (Abb. 21 b). Dieses Verhältnis wurde weder durch die genetische Prädisposition noch durch Änderungen in der diätetischen Selenversorgung beeinflusst.

### 3.1.5 Korrelation von Tumorlast und Serum-Selenspiegel

Bei der Selenbestimmung aus dem Serum von Tieren identischer Versuchsgruppen kommt es immer wieder zu Schwankungen der Messwerte. Für die Bestimmung der Konzentrationen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen ergab sich Variationskoeffizient (CV) von  $21,3 \pm 6,8$  und lag somit deutlich über den messbedingten Schwankungen für diese Methode und das verwendete Probenmaterial (Inter- und Intra-Day CV < 10).

Um zu untersuchen, inwieweit der Genotyp, die Ernährung oder letztlich der Se-Status, der sich aus dem vorliegenden Genotyp in Kombination mit diätetischen Selenversorgung ergibt, mit der Tumorigenese korreliert, erfolgte die graphische Auftragung der Blutselenkonzentration gegen die entsprechenden Werte für die Anzahl sowie die Gesamtfläche aller tumortragenden Versuchstiere. Hier zeigte sich eine negative Korrelation der Selenkonzentration mit der Gesamtumoranzahl (Spearman:  $\rho = -0,474$ ;  $p = 0,026$ ) und der berechneten Gesamtumorfläche (Spearman:  $\rho = -0,519$ ;  $p = 0,013$ ) aller vorliegenden

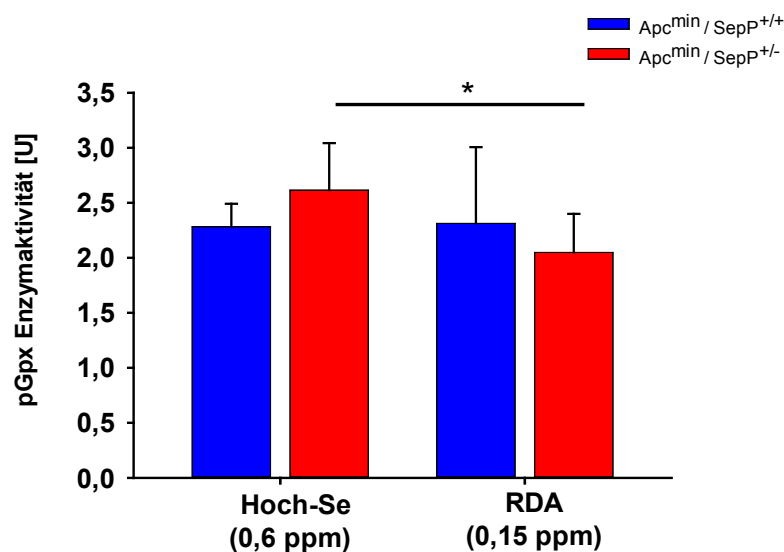
neoplastischen Veränderungen (Abb. 22 a+b). Ein verbesserter Selenstatus, ungeachtet ob wegen eines vorteilhaften Genotyps oder einer erhöhten nutritiven Zufuhr, steht somit in einem eindeutigen Zusammenhang zu einer verringerten Tumorlast in den Versuchstieren. Interessanterweise ordnen sich Werte mit starken Abweichungen zu ihren gruppenspezifischen Mittelwerten sehr gut in der graphischen Darstellung ein. Dies zeigt eindrucksvoll die entscheidende Rolle des Selenstatus für die intestinalen Tumorigenese.



**Abbildung 22: Korrelation des Serum-Selengehaltes zu Gesamtumoranzahl und Gesamtumorfläche in  $Apc^{min}/SepP^{+/+}$ - und  $Apc^{min}/SepP^{-/-}$ -Tieren bei adäquater (0,15 ppm Se) und erhöhter (0,6 ppm Se) diätetischer Selenzufuhr.** Dargestellt sind die verschiedenen Genotypen unter Berücksichtigung der diätetischen Selenversorgung. Die Kästen symbolisieren die jeweiligen Mittelwerte  $\pm$  SD für die Serum-Selenkonzentration des entsprechenden Genotyps ( $n = 24$ ). Tumoranzahl und Fläche korrelieren mit den Selenkonzentrationen im Serum der einzelnen Versuchstiere (Spearman:  $\rho = -0,476$ ;  $p = 0,022$  bzw.  $\rho = -0,512$ ;  $p = 0,013$ ).

### 3.1.6 Gpx-Aktivität im Serum

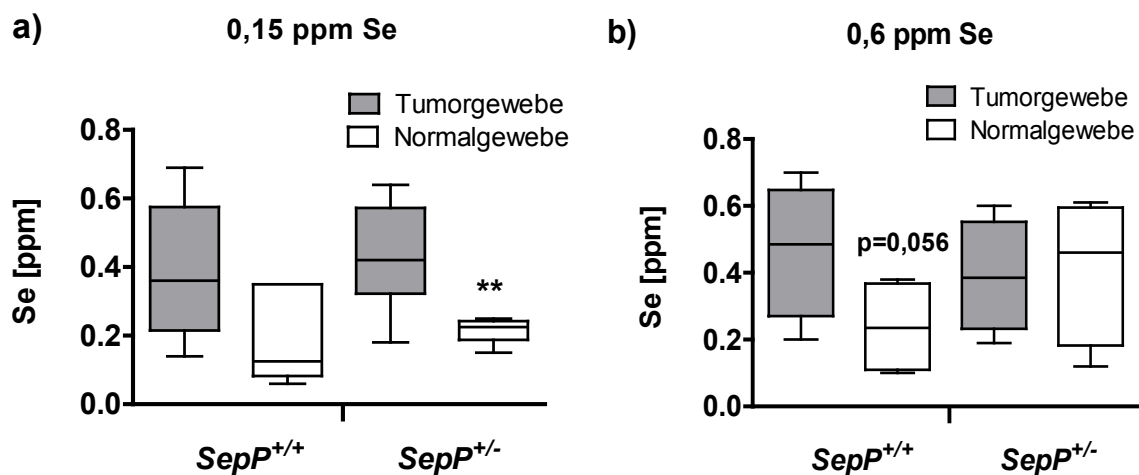
Als zusätzlicher Parameter zur Analyse des allgemeinen Selenstatus der Versuchstiere wurde die Aktivität der plasmatischen Glutathion-Peroxidase (Gpx3) aus den Serumproben der Versuchstiere gemessen. Diese zeigte sich innerhalb der einzelnen Fütterungsgruppen vom Grad der plasmatischen SepP-Versorgung weitgehend unbeeinflusst von den Versuchsbedingungen. Nur bei heterozygoten Tieren führte eine gesteigerte Selenversorgung zu einer signifikant erhöhten Enzymaktivität (Abb. 23).



**Abbildung 23: Gpx-Aktivität in Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/+</sup>- und Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>-Tieren bei adäquater (0,15 ppm) und erhöhter (0,6 ppm) Selenversorgung.** Dargestellt sind die Aktivitäten als Mittelwerte  $\pm$  SD. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede (T-Test; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 8-9$ ). Ein Genotyp-bedingter Effekt auf die Enzymaktivität war unter diesen Bedingungen nicht zu beobachten. Eine gesteigerte Selen-supplementation führt bei heterozygoten Tieren zu einer signifikant erhöhten Enzymaktivität.

### 3.1.7 Selenkonzentrationen im Tumorgewebe

Neben dem Serum zeigen auch Gewebe deutliche Unterschiede im Selengehalt. Die Methode der Total-Reflektions-Röntgenfluoreszenz-Analytik erlaubt eine simultane Bestimmung einzelner Spurenelemente unter Verwendung geringer Probenvolumina. So konnten die Se-Konzentrationen von Tumor- und umgebendem Normalgewebe bestimmt und verglichen werden, um tumorbedingte Unterschiede in der Selenakkumulation zu analysieren. Für das Normalgewebe ergab sich ein mittlerer Selengehalt von 0,2 ppm bezogen auf das Nassgewicht des eingewogenen Gewebes. Der Selengehalt im Tumorgewebe war im Vergleich zum umgebenden Darmgewebe für nahezu alle Versuchsgruppen deutlich erhöht. Eine Ausnahme stellten hierbei die heterozygoten Tiere auf Hoch-Selen Diät dar, bei denen jedoch auch hohe Schwankungen bei der Bestimmung der Konzentrationen im Normalgewebe zu beobachten waren. Keine der Versuchsbedingungen hatte einen Einfluss auf die entsprechenden Verhältnisse der Gewebekonzentration (Abb. 24 a+b). Das verwendete Gewebe wurde aus unterschiedlichen Bereichen des Intestinaltraktes gewonnen. Die Ergebnisse weisen auf eine deutliche Akkumulation von Selen im Tumor während des Krankheitsverlaufs hin.



**Abbildung 24: Selenkonzentrationen in Tumor- und Normalgewebe von *Apc*<sup>min</sup>-Tieren.** Dargestellt sind Konzentrationen als Boxplots, wobei der Median durch eine Querlinie hervorgehoben ist und die Antennen (*Whiskers*) die Perzentile 5 und 95 markieren [ $\mu\text{g/g}$  (Nassgewicht)] (\*\* =  $p < 0.05$ ; T-Test;  $n=4-7$ ). Die Selenkonzentrationen im Tumorgewebe wiesen in allen Versuchsgruppen, mit Ausnahme der heterozygoten Tiere auf Hoch-Selen Diät, deutlich erhöhte Werte im Kontrast zum umliegenden Normalgewebe auf.

Eine Analyse der räumlichen Auflösung der Selenakkumulation im intakten Darmgewebe lieferte keine weiteren Erkenntnisse. Unabhängig von der Lokalisation im Intestinaltrakt war der Selengehalt in allen Darmabschnitten nahezu gleich. Tendenziell erhöhte Konzentrationen (12%) traten in den supplementierten Gruppen auf, waren jedoch nicht signifikant nachzuweisen.

### 3.1.8 Genchip-Analyse

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte mit einer unterschiedlichen Genexpression assoziiert sind, wurde Tumormaterial von Einzeltieren einer Versuchsgruppe vereint und die Transkriptlevel mittels Genchip-Analyse untersucht. Die über die Microarray-Methode ermittelten Expressionsdaten der Tumorpools wurden hinsichtlich eines Genotyp-bedingten Effektes ausgewertet. Nur eine geringe Anzahl von Genen (<10) zeigte sich durch den vorliegenden Allelverlust in *Apc*<sup>min</sup>/*SepP*<sup>+/-</sup>-Tieren verstärkt reguliert ( $\text{FC} > 1,5$ ). Die genauere Betrachtung dieser Gene lieferte jedoch keinen schlüssigen Zusammenhang zum untersuchten Krankheitsbild oder zum Selenmetabolismus.

### 3.1.9 Realtime-PCR

Zusätzlich zur Validierung der Ergebnisse aus den Genchip-Analysen wurde neben den identifizierten Kandidaten auch mittels qRT-PCR die Regulation verschiedener Selenoprotein-Gene im Tumorgewebe und im nicht-neoplastischen Darmepithel untersucht. Bis auf *Dio3* zeigte sich keines der betrachteten Gene in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen reguliert. Insbesondere die adäquat versorgten Tiere wiesen eine verstärkte *Dio3*-Expression auf. Im Einklang mit den Microarray-Daten zeigen sich die Versuchsbedingungen somit weitgehend ohne Effekt auf die Expression von Genen der Selenoproteinbiosynthese und des Selenmetabolismus.

Beim zusätzlichen Vergleich der unterschiedlichen Gewebetypen war hingegen eine Veränderung der Expressionsmuster für bestimmte Gene im Selenmetabolismus festzustellen. Neben einer signifikanten Reduktion der Transkriptmengen für *SepP*, *Dio1* und *SeIM* war die mRNA-Konzentration weiterer Selenoproteine (*Gpx1*, *Gpx2*, *SeIH*) deutlich gesteigert. Für *SepP* tritt die beschriebene Reduktion verstärkt in den heterozygoten Versuchstieren auf, bedingt durch den Allelverlust. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits etablierten Expressionsmuster vorausgegangener Arbeiten (Kipp et al., 2009). Im Einklang mit der festgestellten Anreicherung von Selen im Tumorgewebe ist auch die Expression des SepP-Rezeptors *Lrp8* (ApoER2) erhöht, jedoch nicht von *Lrp2* (Megalin).

Obwohl zum Teil im Tumorgewebe beschrieben oder als krebsrelevant diskutiert, ergab sich für einige Gene keine eindeutige krankheitsbedingte Regulation (*Sep15*, *SeIS*, *SeIW*, *TxnRd1* & 2).

Die gewebsspezifische Genregulation für die einzelnen Versuchsbedingungen ist in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt

**Tabelle 11: Expressionsunterschiede von Selenoprotein- und SepP-Rezeptorgenen im Darmtumor im Vergleich zu normaler Darmmukosa.** Dargestellt sind die relativen Unterschiede der mRNA Expressionen im Vergleich von Tumorgewebe zu Darmmukosa in den entsprechenden Versuchsgruppen (log2 Werte und in Klammern Fold-Change (FC) Werte). Sternchen kennzeichnen signifikante Expressionsunterschiede ermittelt durch die Software REST Version 1.9.12 (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

Gen	RDA (0,15 ppm Se)		Hoch-Se (0,6 ppm Se)	
	<i>Apc</i> <sup>min</sup> / <i>SepP</i> <sup>+/+</sup>	<i>Apc</i> <sup>min</sup> / <i>SepP</i> <sup>+/-</sup>	<i>Apc</i> <sup>min</sup> / <i>SepP</i> <sup>+/+</sup>	<i>Apc</i> <sup>min</sup> / <i>SepP</i> <sup>+/-</sup>
Selenoprotein P (SepP)	-2,4 (0,2)	-3,1 (0,1) *	-1,9 (0,3) **	-2,6 (0,2) *
Glutathion Peroxidase 1 (Gpx1)	1,3 (2,5) *	1,0 (2,0) **	1,1 (2,1) ***	1,1 (2,1) ***
Glutathion Peroxidase 2 (Gpx2)	0,7 (1,6)	0,4 (1,3)	0,6 (1,5)	0,5 (1,4)

Gen	RDA (0,15 ppm Se)		Hoch-Se (0,6 ppm Se)	
	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/+</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/-</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/+</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/-</sup>
Dejodase Typ 1 (Dio1)	-1,3 (0,4)	-1,7 (0,3) *	-1,1 (0,5) p=0,055	-1,6 (0,3) **
Dejodase Typ 3 (Dio3)	11,2 (2352,5) ***	8,6 (388,0) *	0,8 (1,7)	4,0 (16,0) *
Selenoprotein H (SelH)	1,9 (3,7) *	1,9 (3,7) **	1,6 (3,0) ***	1,5 (2,8) ***
Thioredoxin Reduktase 1 (TxnRd1)	0,2 (1,1)	0,2 (1,1)	0,3 (1,2)	0,3 (1,2)
Thioredoxin Reduktase 2 (TxnRd2)	0,4 (1,3)	0,4 (1,3)	0,3 (1,2)	0,2 (1,1)
Selenoprotein 15 (Sel15)	0,0 ( 1)	-0,1 (0,9)	-0,2 (0,9)	0,7 (1,6)
Selenoprotein W (SelW)	0,2 (1,1)	-0,1 (0,9)	0,2 (1,1)	0,2 (1,1)
Selenoprotein S (SelS)	-0,4 (0,8)	-0,4 (0,8)	-0,5 (0,7)	0,2 (1,1)
Selenoprotein M (SelM)	-0,9 (0,5)	-0,8 (0,6)	-0,9 (0,5)	-1,0 (0,5) *
Apolipoprotein E receptor 2 (ApoEr2,Lrp8)	2,5 (5,7) **	2,5 (5,7) **	2,1 (4,3) ***	2,2 (4,6) **
Megalyn (Lrp2)	-0,2 (0,9)	-0,4 (0,8)	-0,5 (0,7)	0,0 (1,0)

Weitergehend zeigten sich auch Transkripte im Tumorgewebe reguliert, die mit einer krankheitsbedingten Immunantwort assoziiert werden können. Hierbei war die Transkriptmenge für die Cyclooxygenase-2 (*Cox2*), Interleukin 6 (*Il6*), Tumor necrosis factor  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ) und Metallothionein 2 (*Mt2*) über alle Versuchsgruppen im entarteten Gewebe signifikant hochreguliert.

In einer vorrausgegangenen Dissertation aus unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise auf eine potentielle Rolle von Mastzellen in der protektiven Wirkung von Selen auf die Krebsentwicklung gefunden (Michaelis, 2008). Aufbauend hierauf wurde die mRNA - Expression der Mastzellproteasen 1 & 2 (*Mcpt1*, *Mcpt2*), der Mastzellcarboxypeptidase (*Cpa3*) und der Tyrosinkinase Kit (*c-kit*) untersucht. Die entsprechenden Transkriptmengen waren im Tumorgewebe deutlich und signifikant erhöht, jedoch unabhängig von den unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

In allen Apc<sup>min</sup> -Tieren waren integrale Bestandteile des APC/Wnt-Signalweges (*catenin beta*, *Tcf*) und das Zielgen *c-myc* in den Tumoren verstärkt exprimiert. Ein Einfluss der Selenstatus-modulierenden Versuchsbedingungen auf die Regulation dieses Signalweges konnte mit den vorliegenden Daten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Als Marker für die Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe zeigte sich *Hif1 $\alpha$*  im Tumorgewebe hochreguliert, jedoch unabhängig von den Versuchsbedingungen. Die Ergebnisse der quantitativen Expressionsanalysen der voraus beschriebenen Gene ist zusammenfassend in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12: Unterschiede der mRNA-Expressionen im Vergleich von Tumorgewebe zu Darmmukosa in den entsprechenden Versuchsgruppen (log2 Werte (FC)).** Sternchen kennzeichnen signifikante Expressionsunterschiede ermittelt durch die Software REST Version 1.9.12 (\*\*\*) =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; n = 6).

Gen	RDA (0,15 ppm Se)		Hoch-Se (0,6 ppm Se)	
	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/+</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/-</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/+</sup>	Apc <sup>min</sup> /SepP <sup>+/-</sup>
Inflammation/ Immunsystem:				
Cyclooxygenase-2 (Cox2)	2,6 (6,1) ***	2,8 (7,0) ***	2,2 (4,6) **	2,3 (4,9) ***
Interleukin 6 (Il6)	4,3 (19,7) **	3,6 (12,1) *	4,2 (18,4) ***	5,4 (42,2) ***
Tumor necrosis factor $\alpha$ (Tnf $\alpha$ )	2,4 (5,3) *	2,1 (4,3) *	2,5 (5,7) **	2,5 (5,7) **
Metallothionein 2 (Mt2)	1,6 (3,0) **	1,6 (3,0) ***	1,4 (2,6) ***	1,5 (2,8) ***
Transforming growth factor $\beta$ (Tgf $\beta$ )	0,7 (1,6)	0,6 (1,5)	0,2 (1,1)	0,7 (1,6)
Mastzellen:				
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	8,2 (294,1) ***	5,9 (59,7) ***	7,6 (194,0) ***	8,3 (315,2) ***
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	8,5 (362,0) ***	6,8 (111,4) ***	8,0 (256,0) **	8,3 (315,2) ***
Mast cell carboxypeptidase A (Cpa3)	8,4 (337,8) ***	7,1 (137,2) ***	8,3 (315,2) **	8,8 (445,7) **
Tyrosinkinase KIT (c-kit)	1,5 (2,8)	1,2 (2,3)	1,2 (2,3) *	0,7 (1,6) **
Wnt-Signalweg:				
T-cell factor (Tcf)	3,2 (9,2) ***	2,1 (4,3)	2,7 (6,5) ***	3,1 (8,6) ***
Catenin, beta ( $\beta$ -cat)	1,2 (2,3)	1,1 (2,1) *	0,9 (1,9) **	0,9 (1,9) ***
c-myc	2,8 (7,0) **	2,5 (5,7) *	2,4 (5,3) ***	2,3 (4,9) ***
Angiogenese:				
Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ (Hif1 $\alpha$ )	1,2 (2,3)	1,1 (2,14)	1,1 (2,14) *	1,5 (2,83) **

### 3.1.10 Gewebsmastzellen

Als Bestandteil der körpereigenen Abwehr spielen Mastzellen vor allem eine Rolle in IgE-vermittelten Typ1-Allergien. Ihre Aktivierung bewirkt durch Degranulation die Freisetzung verschiedener Botenstoffe wie Heparin, Histamin und TNF $\alpha$ . Im Intestinaltrakt sind sie vorwiegend in der Submukosa lokalisiert. In Studien zum Reizdarm-Syndrom konnte eine Überfunktion von Mastzellen nachgewiesen werden und gilt als möglicher Auslöser dieses



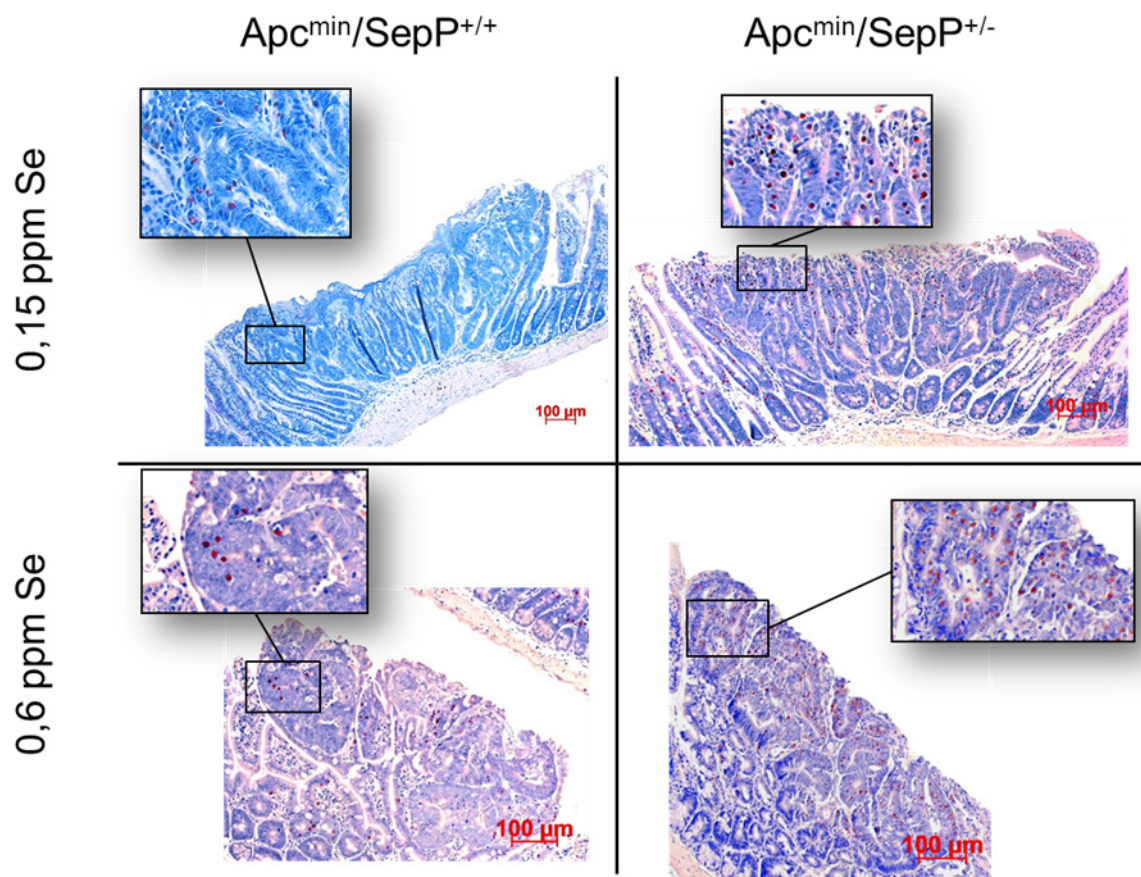
Krankheitsbildes (Frieling et al., 2011). Generell gelten sie in Bezug auf die Tumorprogression eher als wachstumsfördernd, da ihre Proteasen die extrazelluläre Matrix angreifen und die bereits erwähnten Wachstumsfaktoren die Angiogenese und Tumorzellproliferation fördern (Hiromatsu und Toda, 2003).

Wie bereits erwähnt, deuten vorausgegangene Untersuchungen aus dem Jahr 2008 (Michaelis, 2008) und die Ergebnisse der Transkriptanalysen Mastzell-spezifischer Gene auf einen Zusammenhang zwischen der Einwanderung von Mastzellen in das Tumorgewebe und den selenvermittelten protektiven Effekten hin. Microarray-Analysen sowie die spätere Verifizierung durch die qRT-PCR ergaben eine erhöhte Expression mastzellspezifischer Gene (*Mcpt1*, *Mcpt2*, *Cpa3*, *c-Kit*) in den Tumoren von *Apc<sup>min</sup>*-Tieren verglichen mit umliegender, intakter Darmmukosa.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte die quantitative Bestimmung der Mastzellinvasion ins Tumorgewebe der unterschiedlichen Versuchsgruppen einen gesicherten Befund über den Zusammenhang zum Selenstatus liefern.

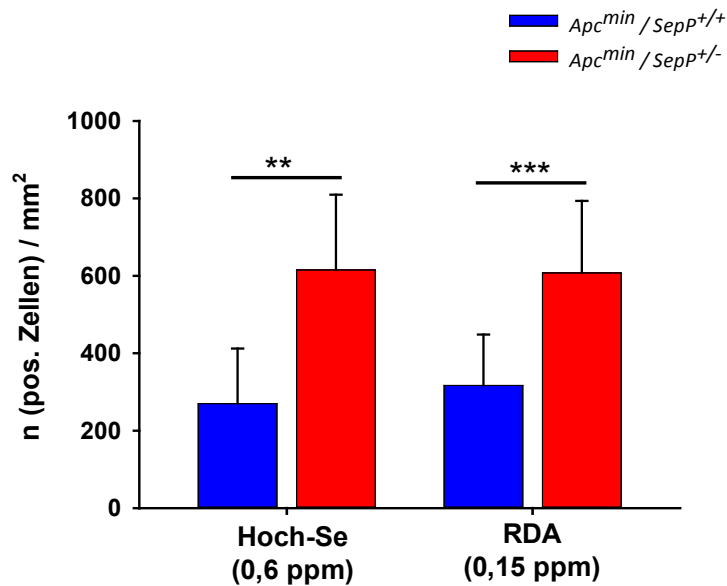
#### 3.1.10.1 Chloracetatesterase-Färbung

Die Identifizierung von Gewebsmastzellen wurde in einem ersten Schritt durch die etablierte Chloracetatesterase-Färbung vorgenommen. Innerhalb beider Fütterungssgruppen zeigten die für das *SepP*-Allel heterozygoten Tiere eine stark erhöhte Anzahl positiv gefärbter Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Unabhängig vom Entartungsgrad und der Größe der Tumore waren die Mastzellen in den Gewebequerschnitten weitgehend apikal und bei geringerem Vorhandensein apikal-lateral lokalisiert (Abb. 25).



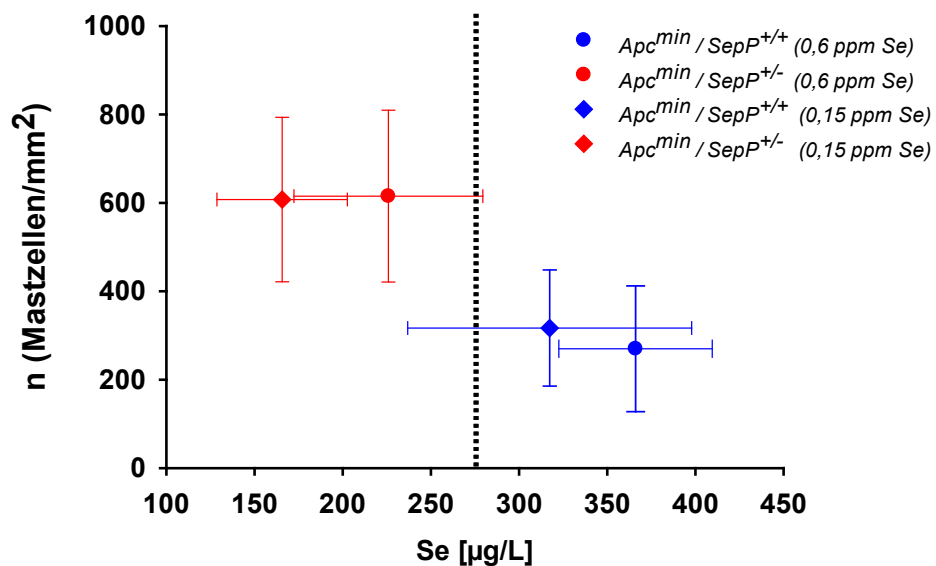
**Abbildung 25: Histologisch Färbung von Gewebsmastzellen im Tumorgewebe.** Dargestellt sind exemplarische Schnitte der einzelnen Versuchsbedingungen. Unabhängig vom Selengehalt des Futters zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl positiv gefärbter Zellen in heterozygoten Tieren.

Zur Quantifizierung der Mastzellverteilung wurde das Verhältnis aus Mastzellanzahl zur Fläche der einzelnen Tumore für jedes Tier bestimmt. Die Auswertung ergab ein um den Faktor zwei erhöhtes Vorkommen von Mastzellen in Tumoren von  $Apc^{min}/SepP^{+/-}$ -Tieren im Vergleich zu Tumoren aus Kontrolltieren bei adäquater ( $p < 0,01$ ) und erhöhter ( $p < 0,001$ ) Selenversorgung. Im Gegensatz zur genetischen Komponente zeigten die unterschiedlichen Fütterungsversuche keinen Effekt auf den Grad der Mastzelldichte im Tumor (Abb. 26).



**Abbildung 26: Quantitative Analyse der Chloracetatesterase-Färbung.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD für positiv gefärbte Zellen/mm<sup>2</sup> (T-Test, \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;  $n = 8-9$ ). Die Anzahl positiv gefärbter Mastzellen in den Tumoren heterozygoter Tiere liegt unabhängig von der Selenversorgung signifikant über den entsprechenden Vergleichsgruppen.

Betrachtet man zusätzlich die vorliegenden Serum-Selenkonzentrationen der unterschiedlichen Versuchsgruppen, zeigt sich deutlich die entscheidende Rolle einer intakten Selenversorgung über zirkulierendes SepP (Abb. 27). Eine verminderte Expression, wie sie in SepP<sup>+/-</sup>-Tieren vorliegt, führte vermutlich über den verringerten Selentransport zu einer konsistent vermehrten Mastzellinvasion, die jedoch unabhängig vom Selenstatus des Gewebes war.

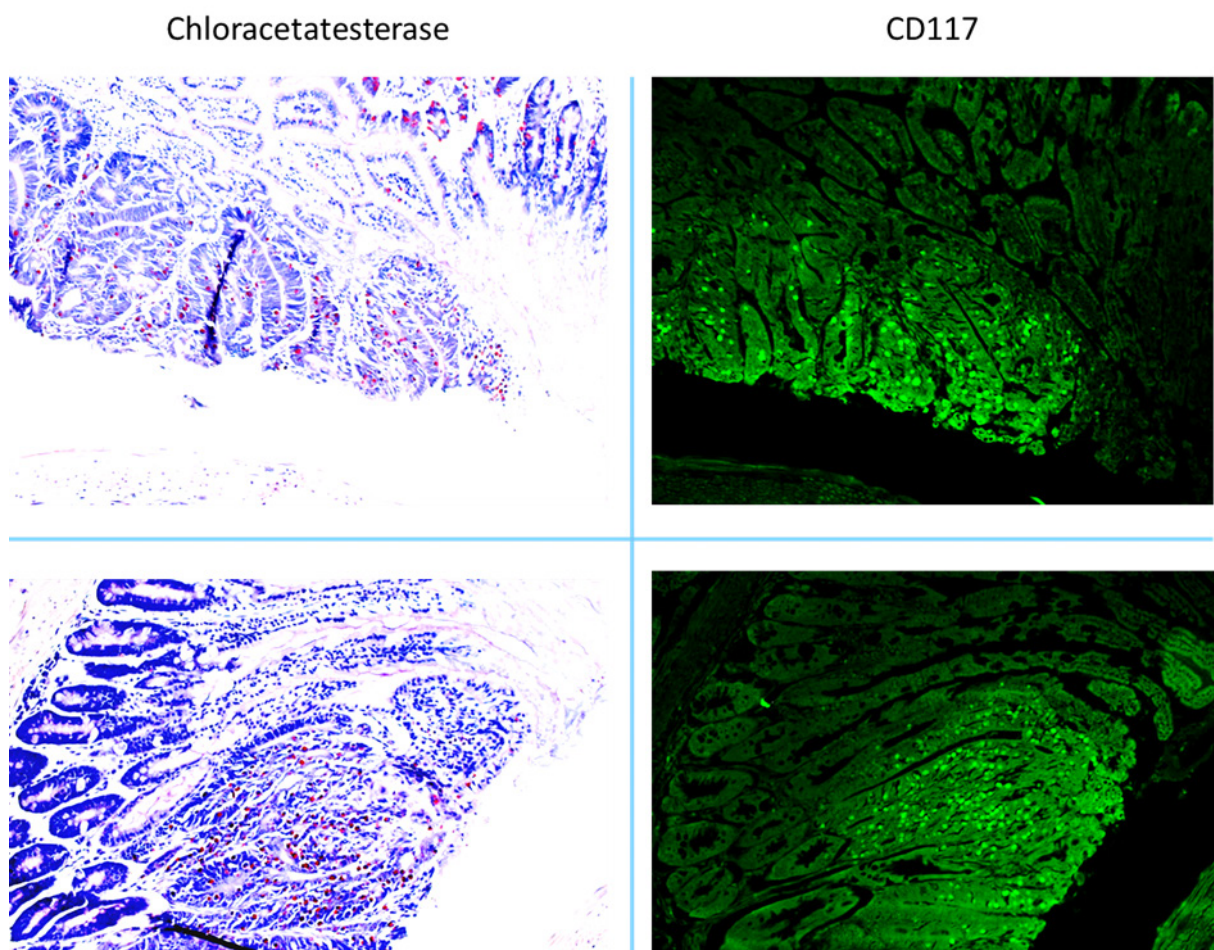


**Abbildung 27: Korrelation der Serum-Selenkonzentrationen zur Mastzellanzahl.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD für die einzelnen Versuchsgruppen. Die Einwanderung von Mastzellen steht in engem Zusammenhang mit den Selenkonzentrationen im Serum der Versuchstiere. Die gestrichelte Linie stellt einen hypothetischen Schwellenwert für die positiven, Genotyp-bedingten Effekte dar.

### 3.1.10.2 CD117

Neben dem Anfärben von Mastzellen dient die Chloracetatesterase-Färbung auch der Sichtbarmachung von neutrophilen Granulozyten. Als weitere Methode zur gesicherten Darstellung von Mastzellen wurde daher die immunhistologische Detektion über einen fluoreszenzmarkierten  $\alpha$ -CD117-Antikörper durchgeführt.

Das Oberflächenprotein CD117 ist der Rezeptor für den Stammzellfaktor, der Mastzellen zur Differenzierung veranlasst. Die auf diese Weise detektierten Mastzellen zeigen ein vergleichbares Verteilungsmuster zur enzymatischen Färbung. Neben den Analogien in Lokalisation und Größe, variierte die Gesamtanzahl von positiven Zellen in den entsprechenden Tumoren nur gering (Abb. 28). Hiermit kann zuversichtlich davon ausgegangen werden, dass es sich bei den über die Chloracetatesterase-Färbung detektierten Zellen in der überwiegenden Mehrheit um Mastzellen handelt.

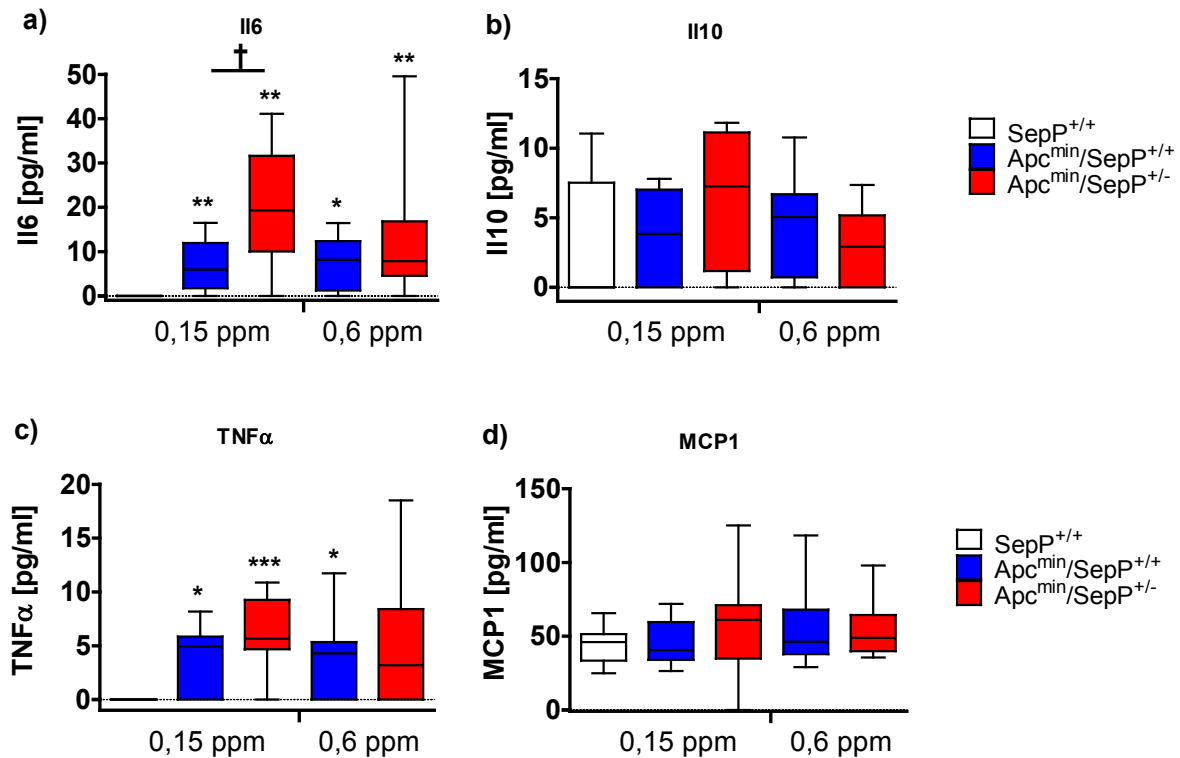


**Abbildung 28: Vergleich unterschiedlicher Nachweismethoden zur Detektion von Mastzellen.** Dargestellt sind exemplarische benachbarte Gewebequerschnitte unterschiedlicher Tiere für einerseits den enzymatischen (Chloracetatesterase) und andererseits den immunhistologischen Nachweis. Größe, Lokalisation und Verteilung der positiv gefärbten Zellen stimmen überein und identifizieren die gefärbten Zellen als Mastzellen.

### 3.1.11 Zytokinkonzentrationen im Serum

Neben dem Nachweis von Mastzellen im Tumorgewebe der Versuchstiere wurden zur genaueren Untersuchung einer veränderten Immunantwort die Konzentrationen einzelner Zytokine (Il6, Il10, MCP1, TNF $\alpha$ ) mittels der Luminex-Multiplex-Analyse im Serum detektiert. Generell zeigten die Messwerte eine hohe individuelle Variabilität zwischen den einzelnen Mäusen. Die Zytokine Il10 und MCP1 blieben von den verschiedenen Versuchsbedingungen unbeeinflusst (Abb. 29 b, d). Krankheitsbedingt zeigten sich die Konzentrationen von Il6 und TNF $\alpha$  im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 29 a, c). Zusätzlich führte die reduzierte *SepP*-Expression in den heterozygoten Tieren zu einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) für die Il6-Konzentrationen in den erkrankten Tieren bei adäquater Selenversorgung. Bei supplementierten Tieren trat dieser Effekt weniger stark

ausgeprägt auf (Abb. 29 a). Ein vergleichbares Muster lässt sich, aufgrund der hohen Variabilität in den individuellen Zytokinexpressionen, für TNF $\alpha$  nur vermuten. Wenn auch nur tendenziell, so deuten die Unterschiede in den Serumsiegeln von Il6 und TNF $\alpha$  übereinstimmend auf eine Genotyp-bedingte Modulation der Immunantwort, die sich auch in der Mastzellichte widerspiegelt.



**Abbildung 29: Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum von Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/+</sup>- und Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>-/-</sup>- Tieren.** Dargestellt sind Konzentrationen als Boxplots, wobei der Median durch eine Querlinie hervorgehoben ist und die Antennen (*Whiskers*) die Perzentile 5 und 95 markieren. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (SepP<sup>+/+</sup>; 0,15 ppm Se). Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen sind durch Kreuze gekennzeichnet (Mann-Whitney-U Test; †/\* =  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;  $n = 8-9$ ). Die Konzentrationen der Zytokine TNF $\alpha$  und Il6 sind in Bezug auf die gesunden Kontrolltiere (RDA) in allen Apc<sup>min</sup>-Tieren signifikant erhöht. Der Allelverlust im SepP-Gen führte auf RDA-Diät zu einem signifikant höheren Serumsiegel von Il6.



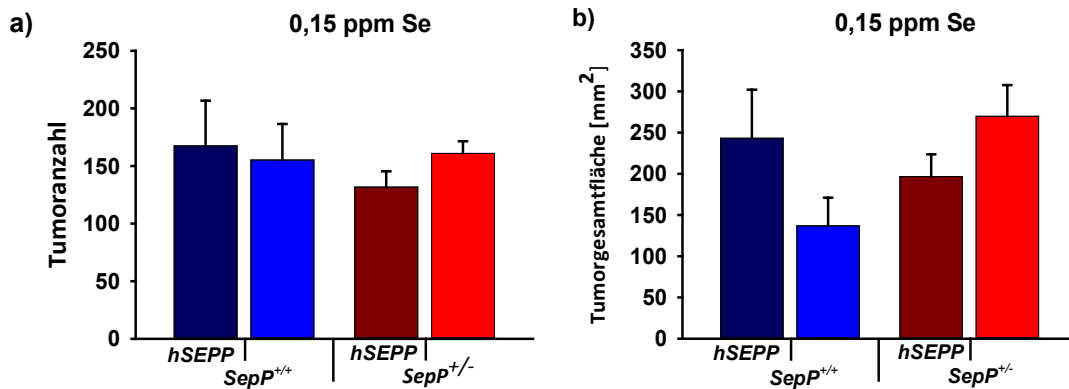
### 3.2 Einfluss der leberspezifischen *hSEPP*-Expression auf die Tumorprogression

Die Mauslinie *hSEPP* exprimiert unter einem leberspezifischen Promoter humanes SEPP, welches von dort in den Blutkreislauf gelangt. Diese Expression genügt, um die Ausprägung des neurologischen Phänotyps bei *SepP<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu verhindern und in männlichen *SepP<sup>-/-</sup>*-Mäusen die Fertilität sicherzustellen (Renko et al., 2008). Eine zusätzliche Expression von *SepP* in weiteren Geweben findet in diesem gewebespezifischen Mausmodell nicht statt. Die Verwendung dieses Tiermodells sollte somit die Bedeutung der Se-Versorgung durch *SepP* über das Blut im Hinblick auf die chemoprotektiven Effekte von Se offenlegen. Besonders interessant hierbei ist der Vergleich von Effekten auf die Tumorigenese bedingt durch lokale Expressionsänderungen unter konstitutiver hepatischer *hSEPP* Expression.

#### 3.2.1 Tumorgroße und Verteilung

##### 3.2.1.1 Adäquate Selenversorgung (0,15 ppm Se)

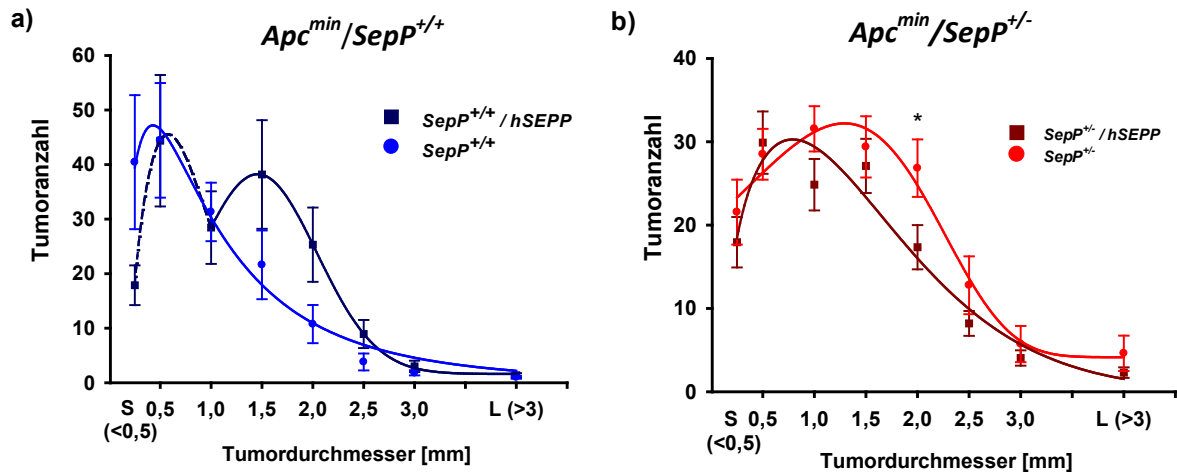
Die Analyse der transgenen (*hSEPP*) Versuchsgruppen wurde analog zu den vorausgegangenen Auswertungen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit des erweiterten Versuchsdesigns zu gewährleisten. Wie auch schon für den Allelverlust im *SepP*-Gen bei nicht-transgenen Tieren, ergibt sich durch die zusätzliche Expression von *hSEPP* keine Auswirkung auf die Anzahl der ausgebildeten Tumore bei adäquater Selenversorgung (0,15 ppm Se). Die Gesamttumorfläche in den transgenen Versuchsgruppen ist für *SepP<sup>+/+</sup>*-Tiere erhöht (45%), zeigt aber bei verminderter Expression des Gens nur geringfügige Unterschiede. Keine der beschriebenen Änderungen zeigte sich jedoch signifikant (Abb. 30 a+b).



**Abbildung 30: Einfluss der zusätzlichen *hSEPP*-Expression auf Tumoranzahl und Gesamtfläche (0,15 ppm Se).** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (Mann-Whitney-U-Test;  $n = 8-10$ ). Der Vergleich der verschiedenen Genotypen zeigte keine Effekte auf die Tumoranzahl. Die Tumorfläche der transgenen *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>*-Tiere war erhöht, jedoch zeigen sich keine signifikante Unterschiede.

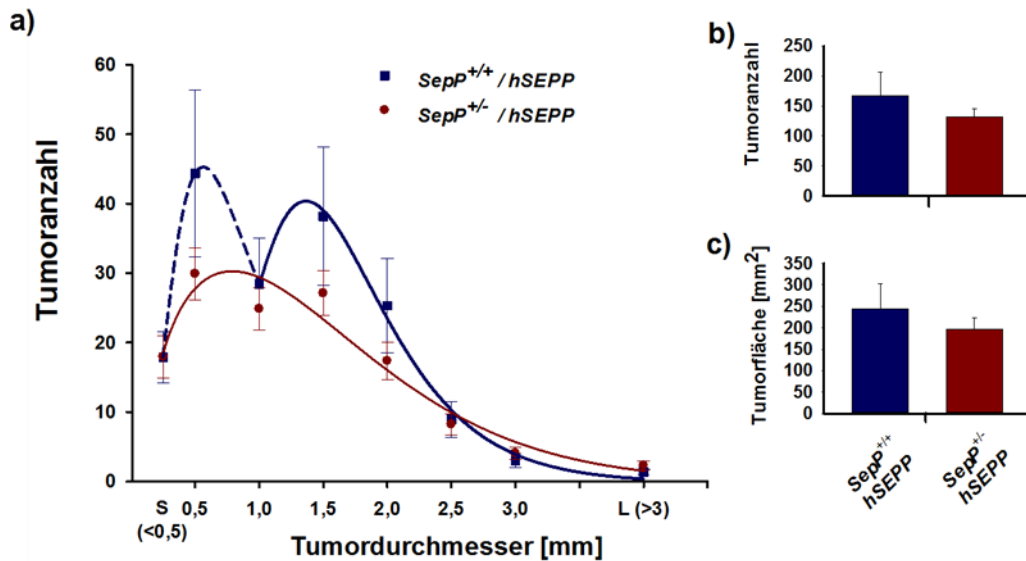
Die Auftragung der Tumoranzahl nach Größe ist sowohl für *SepP<sup>+/+</sup>* als auch *SepP<sup>+/-</sup>*-Tiere weitgehend vergleichbar. Die größten Unterschiede sind für Tumore mit einem Durchmesser von 1,5 – 2 mm festzustellen. *SepP<sup>+/-</sup>*-Tiere entwickeln über den Versuchszeitraum eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Anzahl von Tumoren mit einem Durchmesser von 2 mm, im Vergleich zu den transgenen Versuchsgruppen (Abb. 31 b). Erstaunlicherweise führt die zusätzliche Expression von *hSEPP* bei Wildtyp-Tieren zu einer gegenläufigen Entwicklung, die jedoch hohen interindividuellen Schwankungen unterworfen ist. Für die transgenen Tiere deutet sich auch eine Tumorverteilung mit zwei Maxima an, die durch gestrichelte Linien in der Abbildungen dargestellt ist (Abb. 31 a). Interessanterweise liegen diese Peaks vor und hinter einem Tumordurchmesser von 1 mm, der Größe, ab der ein Tumor auf Angiogenese zum weiteren Wachstum angewiesen ist. Zusammenfassend zeigt dieser Vergleich, dass das zusätzliche Transgen einen tendenziell protektiven Effekt vor dem Hintergrund einer reduzierten *SepP*-Expression hat, es aber zu einer verstärkten Tumorigenese auf dem Wildtyphintergrund kommt. Offenbar ist eine ungestörte *SepP* Expression von beiden Allelen ein Optimum in Bezug auf die Protektion des Darmgewebes vor der Tumorigenese.





**Abbildung 31: Vergleich der Tumorverteilung nicht-transgener und transgener Versuchstiere (0,15 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamttumoranzahl relativ zum Durchmesser (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test, \* =  $p < 0,05$ ,  $n = 8-10$ ). Für beide Versuchsgruppen (*SepP<sup>+/+</sup>*; *SepP<sup>+/-</sup>*) ist ein geringer, aber gegenläufiger Effekt auf die Tumorverteilung festzustellen. Die ungestörte SepP Expression in Wildtyp-Tieren scheint einen optimalen Schutz vor der Entwicklung größerer Darmtumore zu vermitteln.

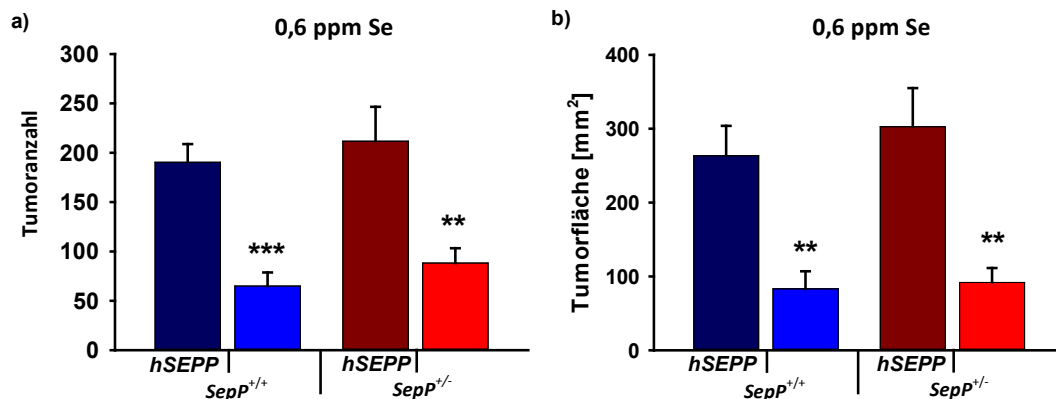
Betrachtet man die transgenen Tiere ausschließlich in Bezug auf den murinen *SepP*-Genotyp, konnte ein genetisch bedingter SepP-Mangel durch die zusätzliche Expression des Transgens kompensiert werden und führte zu einer vergleichbaren Tumorverteilung. Analog zu einer verminderten Expression, wie sie bei heterozygoten Tieren vorliegt, führte aber auch die zusätzliche Expression des Transgens in wildtypischen Tieren zu einer tendenziell gesteigerten Tumorigenese (Abb. 32 b+c). Die Unterschiede traten verstärkt für einzelne Größenkategorien auf ( $\emptyset$ : 0,5 mm; 1,5 mm) (Abb. 32 a). Das Abweichen von einer ungestörten Expression kann somit als Risikofaktor für die Tumorigenese im Darm angesehen werden.



**Abbildung 32: Vergleich der Tumorverteilung innerhalb der transgenen Versuchsgruppen auf RDA-Diät (0,15 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamttumoranzahl relativ zum Durchmesser (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test; n = 8-10). Durch das Transgen wird der Allelmangel der heterozygoten Tiere partiell kompensiert und es kommt zu einer leichten Reduktion von Tumoranzahl und Gesamtfläche im Vergleich zu einer übermäßigen *SepP* Expression in  $SepP^{+/+}/hSEPP$ -Tieren.

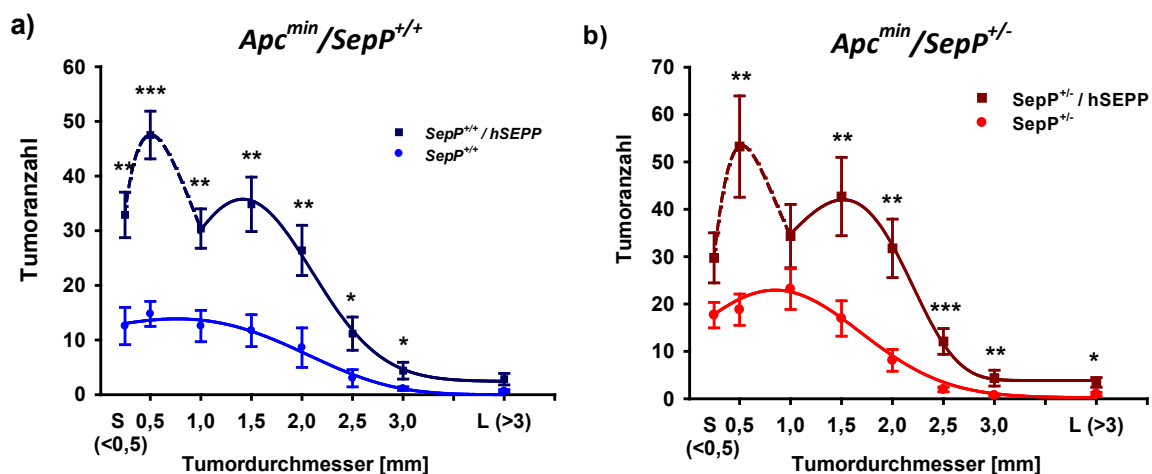
### 3.2.1.2 Erhöhte Selenversorgung (0,6 ppm Se)

Basierend auf dem ersten Versuchsteil zum Einfluss des murinen *SepP*-Genotyps, wurde ein potentieller Effekt des zusätzlichen Transgens auch für eine erhöhte diätetische Selenversorgung untersucht. Vollkommen überraschend und im Kontrast zu den adäquat versorgten Gruppen unterschied sich die Tumorverteilung der transgenen Versuchstiere hierbei wesentlich von den nicht-transgenen Tieren. Die Werte für Tumoranzahl und Gesamtfläche waren um das drei- bis vier-fache gesteigert. Bezogen auf den murinen *SepP*-Genotyp ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 33).



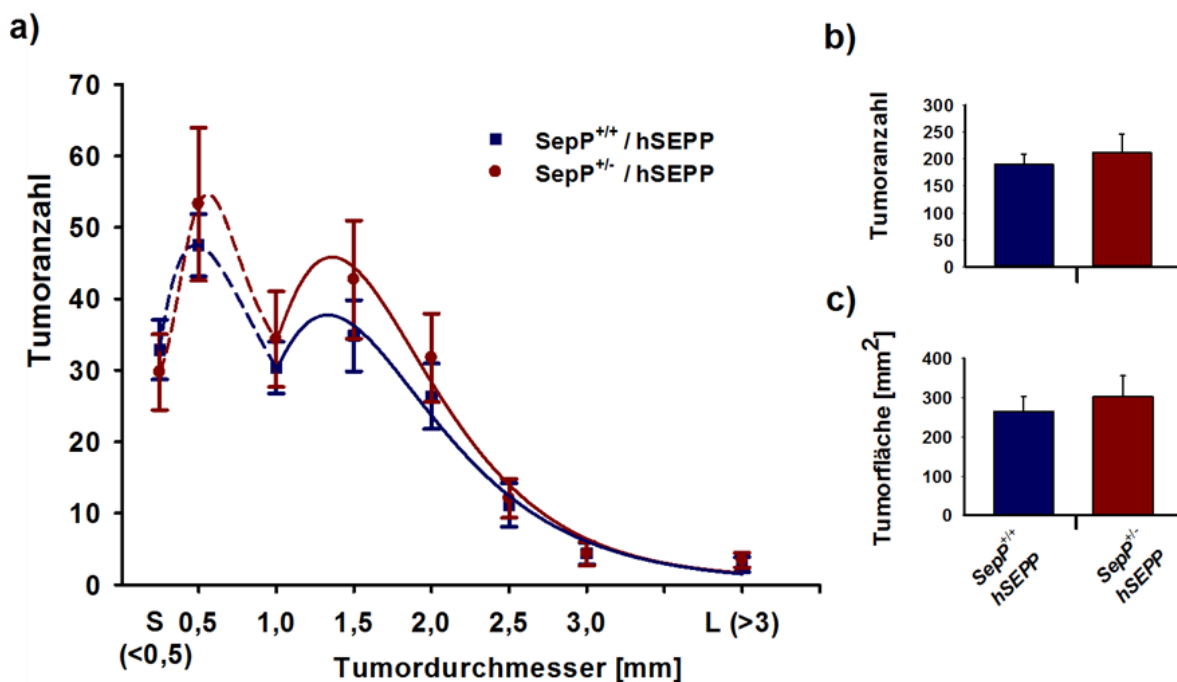
**Abbildung 33: Einfluss der *hSEPP*-Expression auf die Tumoranzahl und Tumorphäche in *Apc*<sup>min</sup>/*SepP*<sup>+/+</sup>- und *Apc*<sup>min</sup>/*SepP*<sup>-/-</sup>-Tieren bei erhöhter Selenversorgung (0,6 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore im Intestinaltrakt (MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test, n = 8-10). Bei erhöhter Selenversorgung ergibt sich für beide Parameter eine deutliche und signifikante Differenz im Vergleich der transgenen Tiere zu den entsprechenden nicht-transgenen Kontrollgruppen.

Die differenzierte Betrachtung der Tumoranzahl in Bezug auf den jeweiligen Durchmesser zeigte, dass sich die vorab beschriebenen Effekte über alle Größenkategorien erstrecken und signifikante Unterschiede zeigen (Abb. 34 a+b). Somit sind offenbar sowohl Initiation als auch Tumorprogression von der additiven hepatischen *hSEPP*-Expression, bei gesteigerter Selenverfügbarkeit, stark beeinflusst. Ebenso war in diesen Gruppen ein verstärkt zweigipfliges Verteilungsmuster festzustellen. Interessanterweise kennzeichnet der auftretende Bruch in den Verteilungsmustern wiederum die Größenkategorie (1-2 mm<sup>3</sup>), ab der ein Tumor auf eine gesteigerte Angiogenese angewiesen ist, um ein weiteres Größenwachstum zu erzielen (Ribatti et al., 2004).



**Abbildung 34: Vergleich der Tumorverteilung nicht-transgener und transgener Versuchstiere (0,6 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamtanzahl relativ zum Durchmesser (MW ± SEM). Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen (Mann-Whitney-U-Test; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001; n = 8-10). Die zusätzliche leberspezifische Expression von *hSEPP* resultiert in einer fulminanten Erhöhung nahezu aller Tumorgößen.

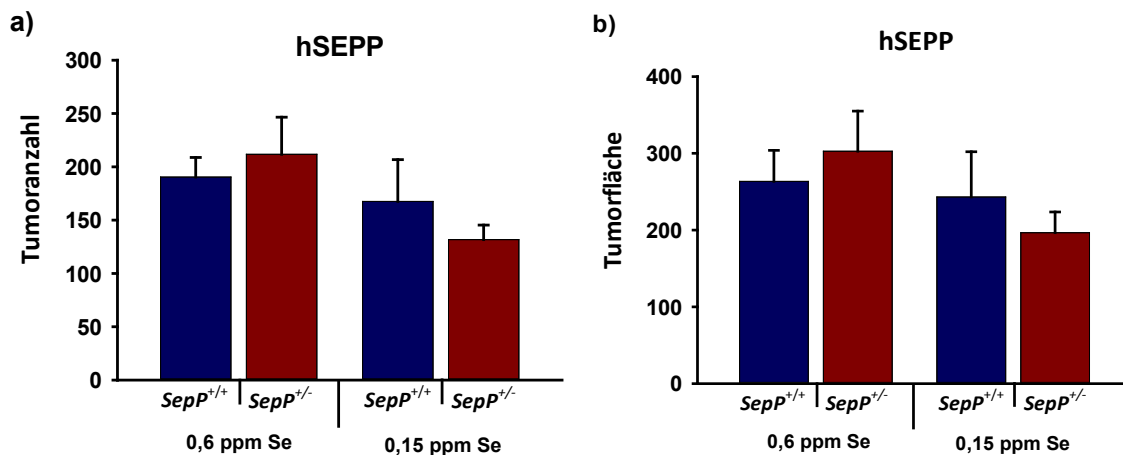
Stellt man die transgenen Tiere mit unterschiedlichem *SepP*-Genotyp gegenüber, unterscheiden sich beide Gruppen nur marginal. Tumoranzahl und die errechnete Gesamtfläche waren im Vergleich nur geringen Abweichungen unterworfen (Abb. 35 b+c). Die graphische Darstellung der Tumorverteilung in Bezug auf den Durchmesser zeigt zusätzlich ein nahezu identisches Verteilungsmuster (Abb. 35 a).



**Abbildung 35: Vergleich der Tumorverteilung innerhalb der transgenen Versuchsgruppen auf Hoch-Selen Diät (0,6 ppm Se).** Dargestellt ist die Gesamtumoranzahl relativ zum Durchmesser (MW  $\pm$  SEM; n = 9-10; Mann-Whitney-U-Test). Beide Versuchsgruppen weisen eine nahezu identische Verteilung der quantifizierten Parameter auf.

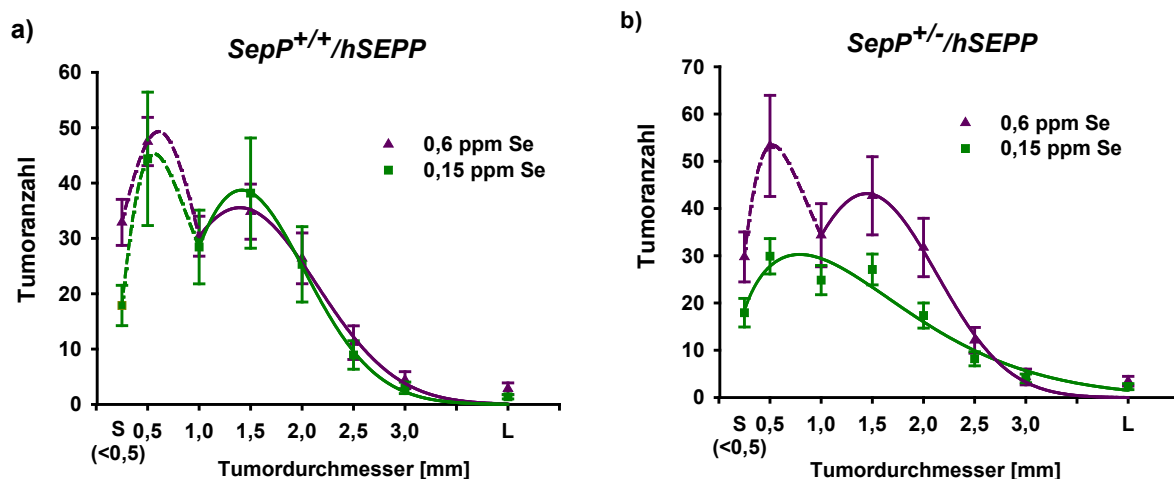
Die im ersten Versuchsteil erläuterten Ergebnisse zum Einfluss der diätetischen Selenversorgung auf die intestinale Tumorigenese zeigen einen protektiven Effekt für *Apc*<sup>min</sup>-Tiere, unabhängig von der genetischen Prädisposition (vgl. 3.1.1.2). Der signifikant positive Effekt verdeutlicht den Stellenwert einer guten Selenversorgung. Deshalb wurden die transgenen Versuchsgruppen ebenfalls hinsichtlich der diätetischen Effekte untersucht.

Hier waren die Parameter Tumoranzahl und Tumorfläche durch die Supplementation leicht erhöht, wobei diese Tendenz für heterozygote Tiere ausgeprägter vorlag (Abb. 36 a+b).



**Abbildung 36: Einfluss der diätetischen Selenversorgung auf die Tumoranzahl und Tumorfläche in den transgenen Versuchsgruppen.** Dargestellt ist die Gesamtanzahl (a) sowie die Gesamtfläche (b) der Tumore im Intestinaltrakt (MW  $\pm$  SEM; n = 8-10; Mann-Whitney-U-Test). Bei erhöhter Selenversorgung zeigen sich Tumoranzahl und Fläche bei beiden *SepP*-Genotypen tendenziell, jedoch nicht signifikant erhöht.

Diese Unterschiede lassen sich bei den Wildtyp-Tieren hauptsächlich auf eine größere Anzahl von Tumoren bis zu einem Durchmesser von 0,5 mm zurückführen (Abb. 37 a). Bei den heterozygoten Tieren verteilte sich dieses Missverhältnis über mehrere Größenkategorien (0,5 - 2 mm), war aber auch in diesem Fall nicht signifikant verschieden (Abb. 37 b).



**Abbildung 37: Einfluss der diätetischen Selenversorgung auf die Größenverteilung in den transgenen Versuchsgruppen.** Dargestellt ist die Gesamttumoranzahl relativ zum Durchmesser (MW  $\pm$  SEM; n = 8-10; Mann-Whitney-U-Test). Für Wildtyp-Tiere zeigt sich insbesondere eine vermehrte Ausbildung kleinerer Tumore, bei heterozygoten Tieren jedoch gesteigerte Anzahl von Tumoren bis zu einem Durchmesser von 2 mm.

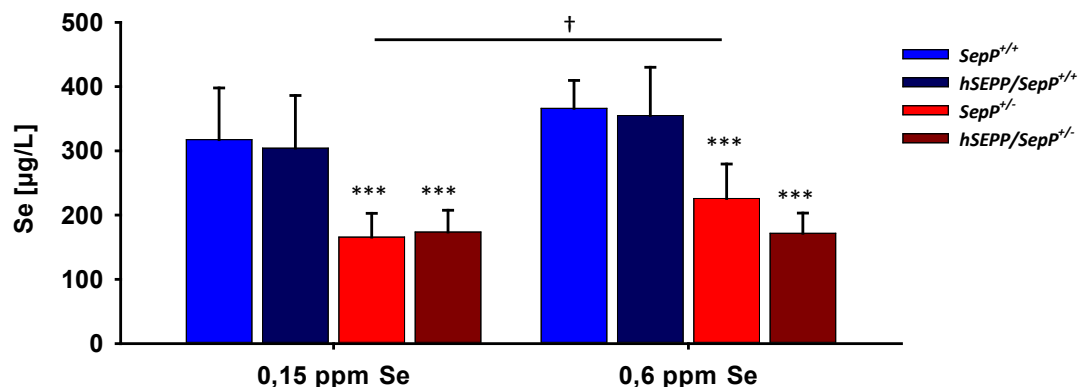
Der positive Einfluss einer erhöhten Selensupplementation konnte somit für die transgenen Versuchsgruppen nicht reproduziert werden. Dieser Versuchsansatz führte auf Grundlage der Tumorverteilungen eher zu einer tendenziellen Umkehr des protektiven Effektes.

### 3.2.2 Körpergewicht

Im Einklang mit den bisherigen Ergebnissen zeigte sich das Körpergewicht der transgenen Versuchsgruppen unbeeinflusst von den Versuchsbedingungen. Analog zu den nicht-transgenen Tieren waren die mittleren Gewichte der weiblichen Versuchstiere leicht erniedrigt. Der Vergleich von transgenen zu nicht-transgenen Tieren lieferte ebenfalls keine Anzeichen auf das Vorliegen einer Tumorkachexie.

### 3.2.3 Selenkonzentrationen im Serum

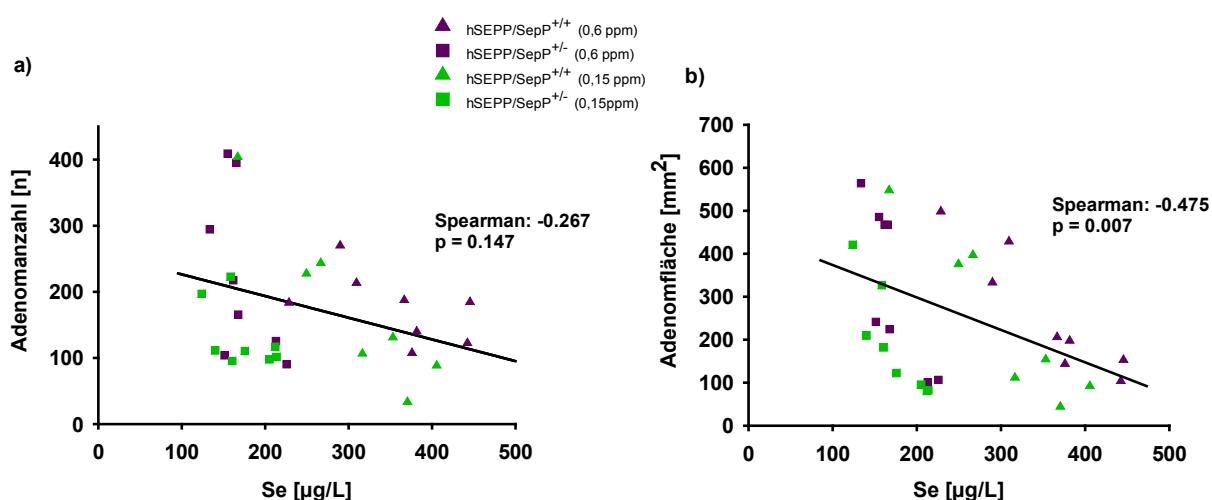
Die Serum-Selenspiegel der transgenen Versuchsgruppen lagen zum finalen Versuchszeitpunkt (Tag 120) auf dem Niveau der nicht-transgenen Gruppen. Die Konzentrationen waren auch in diesem Fall unabhängig vom Grad der Selenversorgung über die Nahrung. Die additive Expression von *hSEPP* führte im vorliegenden Tiermodell, bei zu diesem Zeitpunkt maximaler Tumorentwicklung, nicht zu einer vermehrten Anreicherung von Selen im Blut (Abb. 38). Da aber die Selenkonzentration im Blut mit der Tumorlast normalerweise abfällt (vgl. Abb. 22), kann davon ausgegangen werden, dass dieses Ergebnis das Resultat zweier gegenläufiger Effekte darstellt (leicht erhöhte SepP Konzentrationen im Blut versus tumorbedingte Reduktion der SepP Expression).



**Abbildung 38: Serum-Selenkonzentrationen transgener Tiere im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollgruppen.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD. Sternchen kennzeichnen signifikante Effekte bezogen auf den murinen *SepP*-Genotyp (vgl. Abb. 21). (Mann-Whitney-U-Test; † =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;  $n = 8-10$ ). Die Reduktion der Selenkonzentrationen im Serum von *hSEPP/Apc*<sup>min</sup>/*SepP*<sup>+/-</sup>-Tieren erfolgte analog zu den bisherigen Beobachtungen in den nicht-transgenen Kontrollgruppen. Die zusätzliche Expression ist somit ohne Effekt auf die Selenspiegel zum Zeitpunkt maximaler Tumorigenese.

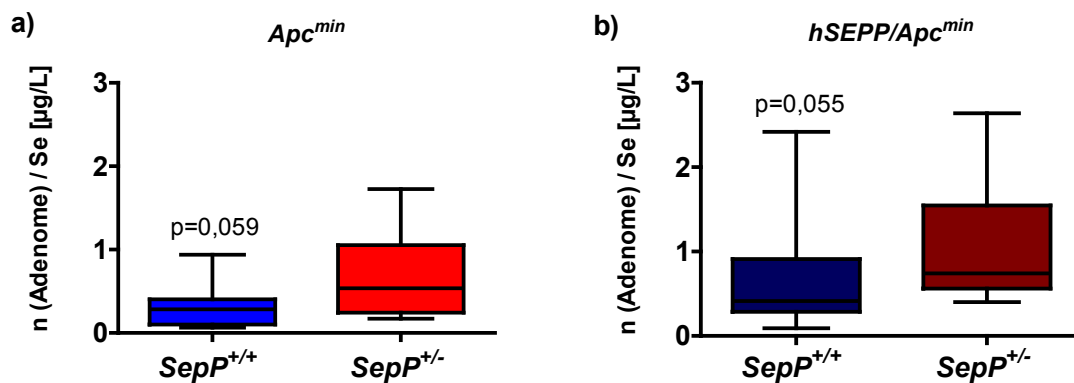
Die Ergebnisse zur Tumorverteilung in den transgenen Versuchsgruppen zeigten einen vollkommen unerwarteten Trend bei erhöhter Selenversorgung und deuten einen

kontraproduktiven Effekt auf die einzelnen Phasen der Tumorentwicklung an. Bei der Auftragung der Tumoranzahl bzw. Tumorfläche gegen die Serumselenspiegel ergab sich jedoch eine signifikante Korrelation ( $p = 0,007$ ;  $r = -0,475$ ; Abb. 39 a) für die Gesamtfläche. Für die Anzahl der Tumore im Intestinaltrakt war dieser Zusammenhang deutlich schwächer ausgeprägt ( $p = 0,147$ ;  $r = -0,267$ ; Abb. 39 b). Die Abhängigkeit beider Parameter von den Selenkonzentrationen ist im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren schwächer ausgeprägt und die Versuchsgruppen unterliegen einer abweichenden Verteilung im Korrelationsdiagramm.



**Abbildung 39: Korrelation der Tumoreigenschaften mit den Selenkonzentrationen im Serum der transgenen Versuchstiere.** Dargestellt sind die verschiedenen Genotypen unter Berücksichtigung der diätetischen Selenversorgung. Tumoranzahl und Fläche korrelieren mit den Selenkonzentrationen im Serum der einzelnen Versuchstiere (Spearman:  $\rho = 0,267$ ;  $p = 0,147$  bzw.  $\rho = -0,475$ ;  $p = 0,007$ ;  $n = 31$ ).

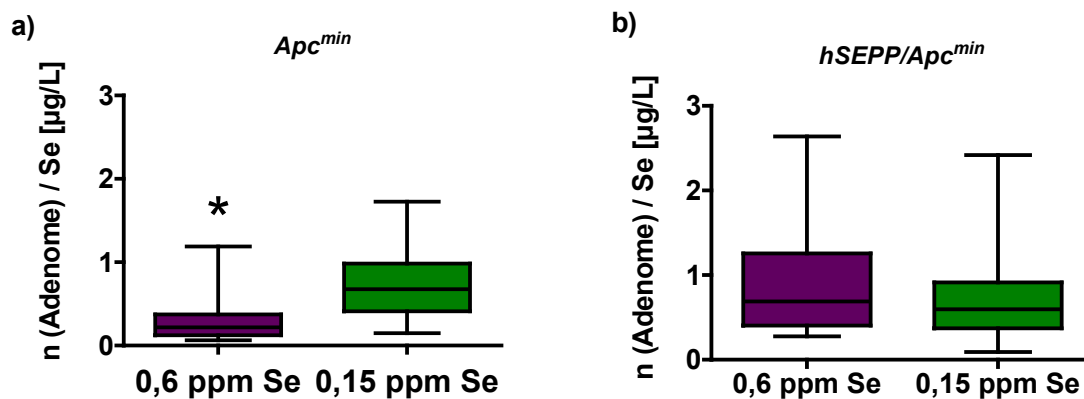
Um diese Abweichungen genauer zu beleuchten, wurde ein entsprechender Koeffizient (Tumoranzahl / Selenkonzentration im Serum) gebildet und die Mittelwerte in übergeordneten Versuchsgruppen gegenübergestellt. Die Verwendung dieses Koeffizienten ermöglicht eine Aussage über die Tumorlast der einzelnen Versuchstiere in Relation zum plasmatischen Selenspiegel. Der gegenseitige Vergleich der *SepP*-Genotypen von nicht-transgenen und transgenen *Apc<sup>min</sup>*-Tieren, unter Vernachlässigung der unterschiedlichen Futtergruppen, zeigte einen erhöhten Koeffizienten ( $p = 0,059$  bzw.  $p = 0,055$ ) für die heterozygoten Versuchsgruppen (Abb. 40 a+b). Das Vorhandensein des Transgens führte hierbei zu einem generell höheren Wert für den errechneten Koeffizienten.



**Abbildung 40: Vergleich der Tumorkoeffizienten bezogen auf den murinen SePP-Genotyp.** Dargestellt sind Boxplots zu den Mittelwerten der Koeffizienten von (a) nicht-transgenen und (b) transgenen Versuchstieren (Mann-Whitney-U Test; n = 8-10). Der Allelverlust im *SepP*-Gen führt zu einer deutlichen Erhöhung des errechneten Koeffizienten unabhängig von der diätetischen Selenversorgung. Die Expression des humanen SEPP hat keine Auswirkung auf diese Unterschiede, führt jedoch zu einem in beiden Fällen erhöhten Ausgangsniveau.

Führt man denselben Vergleich hinsichtlich der unterschiedlichen Futterstrategien durch, ergibt sich ein abweichender Effekt. Die Selen-Supplementation führt in den nicht-transgenen Tieren zu einer signifikanten Verringerung des Koeffizienten (Abb. 41 a). Dies entspricht dem Bild, wie es vorab für den Vergleich zwischen intaktem und gestörtem Selenmetabolismus beschrieben wurde. Ein vollkommen anderes Bild liefert der analoge Vergleich für die transgenen Versuchsgruppen. Hier führt die zusätzliche Gabe von Selen über die Nahrung eher zu einer Erhöhung des Koeffizienten (Abb. 41 b) und weist auf eine deutlich höhere Tumorigenese hin.



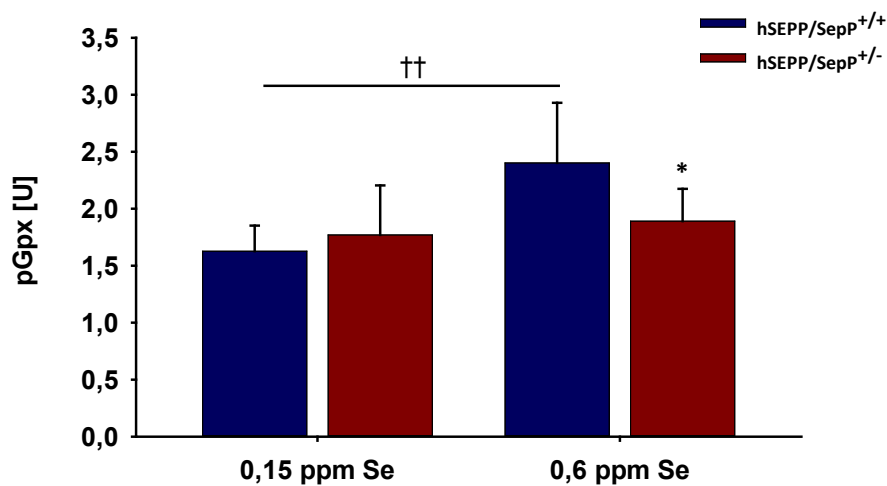


**Abbildung 41: Vergleich der Tumorkoeffizienten bezogen auf die Selenversorgung.** Dargestellt sind Boxplots zu den Mittelwerten der Koeffizienten aus Tumoranzahl zum Serum-Selenspiegel (Mann-Whitney-U Test; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 8-10$ ). Für die nicht-transgenen Tiere resultiert die erhöhte Selenversorgung nicht in einer Erniedrigung des Koeffizienten aus Tumoranzahl zum Selengehalt im Serum, d.h., in den transgenen Tieren stellt 0,15 ppm Se eine bessere chemopräventive Diät dar als es eine supplementierte Ernährung mit 0,6 ppm Se würde.

Diese Auswertungen unterstreichen die bisherigen Ergebnisse zur Tumorverteilung in den einzelnen Versuchsgruppen und veranschaulichen die Rolle der Selenversorgung und der genetischen Prädisposition der Versuchstiere für die intestinale Tumorigenese. Analog zu den nicht-transgenen Tieren führte der *SepP*-Allelverlust in den transgenen Versuchsgruppen ebenfalls, wenn auch weniger stark ausgeprägt, zu einem ganzheitlich schlechteren Krankheitsbild. Erstaunlicherweise bewirkte jedoch eine erhöhte Selenversorgung bei paralleler hepatischer Expression von humanem SEPP nicht eine verstärkte Protektion, wie es bei nicht-transgenen Tieren beobachtet werden konnte. Die zusätzliche Gabe von Selen resultierte hier sogar in einer, relativ zum Selengehalt, höheren Tumorlast im Intestinaltrakt der untersuchten Tiere.

### 3.2.4 Gpx-Aktivität im Serum (hSEPP)

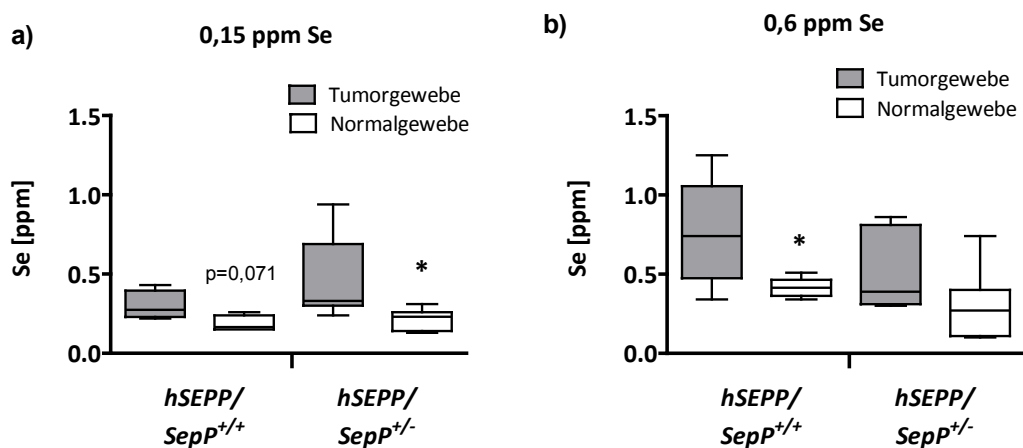
Eine gesteigerte Selenversorgung spiegelte sich bei  $hSePP/SepP^{+/+}$ -Tieren auch in einer signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöhten Enzymaktivität der Gpx3 wider. Genotyp-bedingte Effekte konnten nur in den Versuchsgruppen beobachtet werden, die eine Hoch-Selen Diät erhielten. Hier führte der *SepP*-Allelverlust zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) verringerten Enzymaktivität (Abb. 42).



**Abbildung 42: GPx-Aktivität im Serum der transgenen Versuchsgruppen (hSEPP/Apc<sup>min</sup>).** Dargestellt sind die Aktivitäten als Mittelwerte  $\pm$  SD (T-Test; †† =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 7-8$ ). Eine erhöhte Zufuhr von Selen über die Nahrung führte in den transgenen Apc<sup>min</sup>-Tieren zu einer gesteigerten Enzymaktivität nur bei Wildtyp-Tieren. Der Allelverlust im *SepP*-Gen in dieser Fütterungsgruppe geht einher mit einer erniedrigten Enzymaktivität.

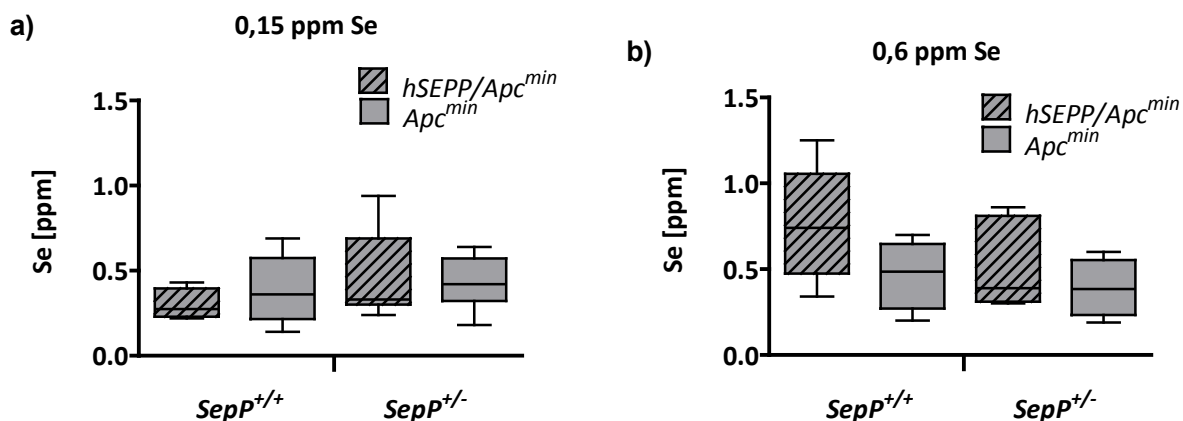
### 3.2.5 Selenkonzentrationen im Tumorgewebe von hSEPP/Apc<sup>min</sup>-Tieren

Der Selengehalt in Tumorgewebe von hSEPP/Apc<sup>min</sup>-Tieren war, unabhängig von den Fütterungsbedingungen oder dem Allelverlust im murinen *SepP*-Gen, konsistent und größtenteils signifikant erhöht (Abb. 43 a+b). Die Mittelwerte der Gewebekonzentrationen lagen bei adäquatem Futter im Bereich der nicht-transgenen Versuchsgruppen. Die Werte für die supplementierten Versuchsgruppen waren vergleichsweise höher (Abb. 43 b).



**Abbildung 43: Selenkonzentrationen in Tumor- und Normalgewebe von *hSEPP/Apc<sup>min</sup>*-Tieren.** Dargestellt sind Konzentrationen als Boxplots, wobei der Median durch eine Querlinie hervorgehoben ist und die Antennen (*Whiskers*) die Perzentile 5 und 95 markieren [ $\mu\text{g/g}$  (Nassgewicht)]. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gewebetypen (\*\* =  $p < 0.05$ ; T-Test;  $n = 4-7$ ). Die Selenkonzentrationen im Tumorgewebe weisen in allen Versuchsgruppen deutlich erhöhte Werte im Kontrast zum umliegenden Normalgewebe auf.

Die Gegenüberstellung des Selengehaltes im Tumorgewebe für sowohl transgene als auch nicht-transgene Versuchsgruppen ergab tendenzielle Unterschiede. Bei einem Selengehalt von 0,15 ppm in der Nagerdiät zeigten sich keine Unterschiede in den Gewebekonzentrationen (Abb. 44 a). Wird die Selengabe jedoch erhöht, führt die hepatische SEPP-Expression auch zu einer leicht gesteigerten Akkumulation von Selen im Tumorgewebe (Abb. 44 b).



**Abbildung 44: Selenkonzentrationen in Tumoren von transgenen und nicht-transgenen *Apc<sup>min</sup>*-Tieren.** Dargestellt sind Konzentrationen als Boxplots [ $\mu\text{g/g}$  (Nassgewicht)]. Der Vergleich der unterschiedlichen Versuchsgruppen deutet auf eine vermehrte Akkumulation von Selen im Tumorgewebe von *hSEPP/Apc<sup>min</sup>*-Tieren, bei erhöhter Selengabe hin.

### 3.2.6 Realtime-PCR

Bei der Quantifizierung der Transkriptmengen von Selenoproteingen und SepP-Rezeptorgenen ergaben sich für wenige Gene Unterschiede, die auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückgeführt werden können. Eine Ausnahme bildet hierbei wiederum die *SepP*-Expression, die durch den partiellen *knock-out* in den heterozygoten Tieren in einer verstärkten Reduktion im Tumorgewebe resultierte. Analog zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen zeigt sich für die *Dio3* wiederum eine verstärkte Expression in den nicht-supplementierten Versuchsgruppen. Die Expressionsmuster bestätigen die Ergebnisse des ersten Versuchsteils. Die Expression von *Lrp8* ist zwar auch in den supplementierten transgenen Tieren erhöht, kann aber die futterbedingten Unterschiede in der Selenakkumulation nicht vollständig erklären.

**Tabelle 13: Expressionsunterschiede von Selenoprotein- und SepP-Rezeptorgenen im Darmtumor im Vergleich zu normaler Darmmukosa.** Dargestellt sind die relativen Unterschiede der mRNA Expressionen im Vergleich von Tumorgewebe zu Darmmukosa in den entsprechenden Versuchsgruppen (log2 Werte und in Klammern Fold-Change (FC) Werte). Sternchen kennzeichnen signifikante Expressionsunterschiede ermittelt durch die Software REST Version 1.9.12 (\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ).

Gen	RDA (0,15 ppm Se)		Hoch-Se (0,6 ppm Se)	
	$Apc^{min}/SepP^{+/+}$	$Apc^{min}/SepP^{+/-}$	$Apc^{min}/SepP^{+/+}$	$Apc^{min}/SepP^{+/-}$
Selenoprotein P (SepP)	-1,8 (0,3)	-3,0 (0,1) *	-1,7 (0,3)	-2,5 (0,2) *
Glutathion Peroxidase 1 (Gpx1)	1,3 (2,5) *	1,1 (2,1) ***	1,0 (2,0) ***	1,0 (2,0) ***
Glutathion Peroxidase 2 (Gpx2)	0,7 (1,6)	0,4 (1,3)	-0,5 (0,7)	0,4 (1,3)
Dejodase Typ 1 (Dio1)	-1,2 (0,4)	-1,5 (0,4) *	-1,5 (0,4) *	-1,4 (0,4)
Dejodase Typ 3 (Dio3)	13,9 (15286) **	12,8 (7131) ***	1,5 (2,8)	1,4 (2,6)
Selenoprotein H (SelH)	2,1 (4,3) ***	2,3 (4,9) ***	2,2 (4,6) **	2,7 (6,5) ***
Thioredoxin Reduktase 1 (TxnRd1)	0,1 (1,1)	0,2 (1,1)	0,4 (1,3) ***	0,4 (1,3)
Thioredoxin Reduktase 2 (TxnRd2)	0,3 (1,2)	0,5 (1,4)	0,5 (1,4) **	0,5 (1,4)
Selenoprotein 15 (Sel15)	0,7 (1,6)	0,3 (1,2)	0,6 (1,5)	1,0 (2,0) *
Selenoprotein M (SelM)	-0,6 (0,7)	-1,0 (0,5)	-1,1 (0,5) *	-1,1 (0,5) **
Selenoprotein S (SelS)	0,1 (1,1)	0,2 (1,1)	0,2 (1,1)	0,2 (1,1)
Selenoprotein W (SelW)	0,2 (1,1)	0,2 (1,1)	0,1 (1,1)	0,1 (1,1)
Megalin (LRP2)	-0,2 (0,9)	-0,4 (0,8)	-0,6 (0,7)	-1,0 (0,5)
Apolipoprotein E receptor 2 (ApoEr2, Lrp8)	2,3 (4,9) ***	2,4 (5,3) ***	2,2 (4,6) ***	2,4 (5,3) ***

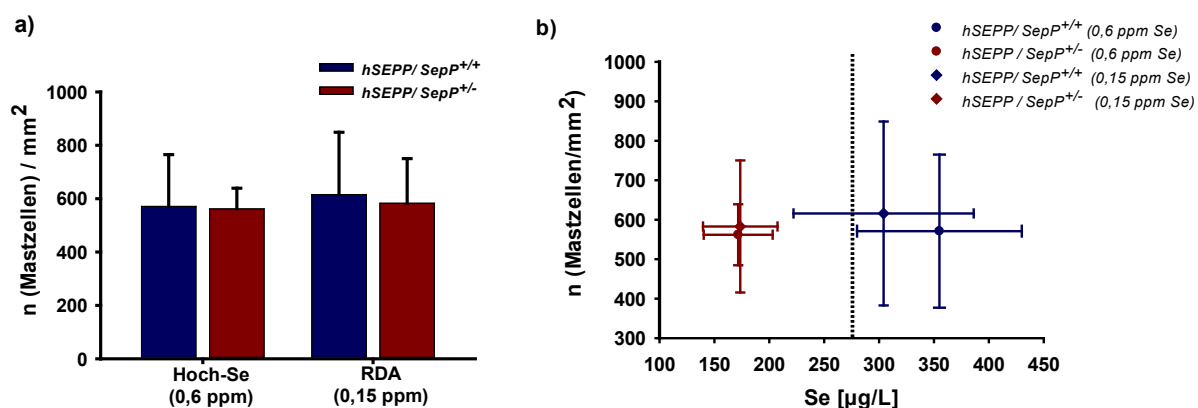
Die untersuchten Inflammationsmarker waren auch in den transgenen  $Apc^{min}$ -Tieren deutlich reguliert, wiesen aber nicht auf einen Zusammenhang zwischen Selenmetabolismus und Grad der lokalen Inflammation hin. Sowohl Mastzell-spezifische Gene als auch Aktivitätsmarker des WNT-Signalweges waren sowohl vom verabreichten Futter als auch dem genetischen Hintergrund unbeeinflusst. In Tabelle 14 sind die entsprechenden Ergebnisse der Expressionsanalysen analog zum ersten Versuchsteil dargestellt.

**Tabelle 14: Unterschiede der mRNA-Expression im Vergleich von Tumorgewebe zu Darmmukosa in den entsprechenden transgenen Versuchsgruppen (log2 Werte).** Sternchen kennzeichnen signifikante Expressionsunterschiede ermittelt durch die Software REST Version 1.9.12 (\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ; n = 6).

Gen	RDA (0,15 ppm Se)		Hoch-Se (0,6 ppm Se)	
	$Apc^{min}/SepP^{+/+}$	$Apc^{min}/SepP^{+/-}$	$Apc^{min}/SepP^{+/+}$	$Apc^{min}/SepP^{+/-}$
Inflammation/ Immunsystem:				
Cyclooxygenase-2 (Cox2)	2,7 (6,5) ***	2,3 (4,9) ***	2,2 (4,6) ***	2,7 (6,5) ***
Interleukin 6 (Il6)	5,3 (39,4) ***	5,1 (34,3) ***	5,4 (42,2) ***	4,6 (24,3) ***
Tumor necrosis factor $\alpha$ (Tnf $\alpha$ )	2,0 (4,0) *	2,6 (6,1) ***	2,2 (4,6) ***	2,5 (5,7) ***
Metallothionein 2 (Mt2)	1,8 (3,5) ***	1,6 (3,0) ***	1,5 (2,8) **	1,7 (3,2) ***
Transforming growth factor $\beta$ (Tgf $\beta$ )	1,6 (3,0) *	1,7 (3,2) ***	1,1 (2,1) **	1,0 (2,0)
Mastzellen:				
Mast cell protease 1 (Mcpt1)	8,4 (337,8) ***	8,0 (256,0) ***	8,7 (415,9) ***	8,0 (256,0) **
Mast cell protease 2 (Mcpt2)	8,8 (445,7) ***	8,3 (315,2) ***	8,6 (388,0) ***	8,0 (256,0) ***
Mast cell carboxypeptidase A (Cpa3)	9,2 (588,1) **	9,3 (630,3) **	9,5 (724,1) **	8,8 (445,7) **
Tyrosinkinase KIT (c-kit)	1,3 (2,5) **	1,5 (2,8) **	1,3 (2,5) *	1,3 (2,5) **
Wnt-Signalweg:				
T-cell factor (Tcf)	3,3 (9,8) ***	3,8 (13,9) **	3,5 (11,3) ***	3,4 (10,6) **
Catenin, beta ( $\beta$ -cat)	1,6 (3,0) *	1,5 (2,8) ***	1,3 (2,5) **	1,4 (2,6) ***
c-myc	2,2 (4,6) **	2,4 (5,3) ***	1,7 (3,2) ***	2,1 (4,3) ***
Angiogenese:				
Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ (Hif1 $\alpha$ )	1,7 (3,2) *	1,8 (3,5) **	1,9 (3,7) **	1,9 (3,7) ***

### 3.2.7 Mastzellen

Die histologische Auswertung zum Grad der Mastzellinvasion ergab für die transgenen Versuchsgruppen wiederum ein verändertes Verteilungsmuster. Im Gegensatz zu den nicht-transgenen Versuchstieren war die Anzahl der Mastzellen im Tumorgewebe nicht abhängig vom *SepP*-Genotyp und zeigte sich unverändert (Abb. 45 a). Die zusätzliche hepatische *hSEPP*-Expression resultierte für beide Fütterungsstrategien in einer Mastzellichte, die mit der von *Apc<sup>min</sup>/SepP<sup>+/-</sup>*-Tieren vergleichbar ist. Betrachtet man zusätzlich die zugrunde liegenden plasmatischen Selenkonzentrationen, ist keine Abhängigkeit von der Serum-Selenkonzentration festzustellen (Abb. 45 b).

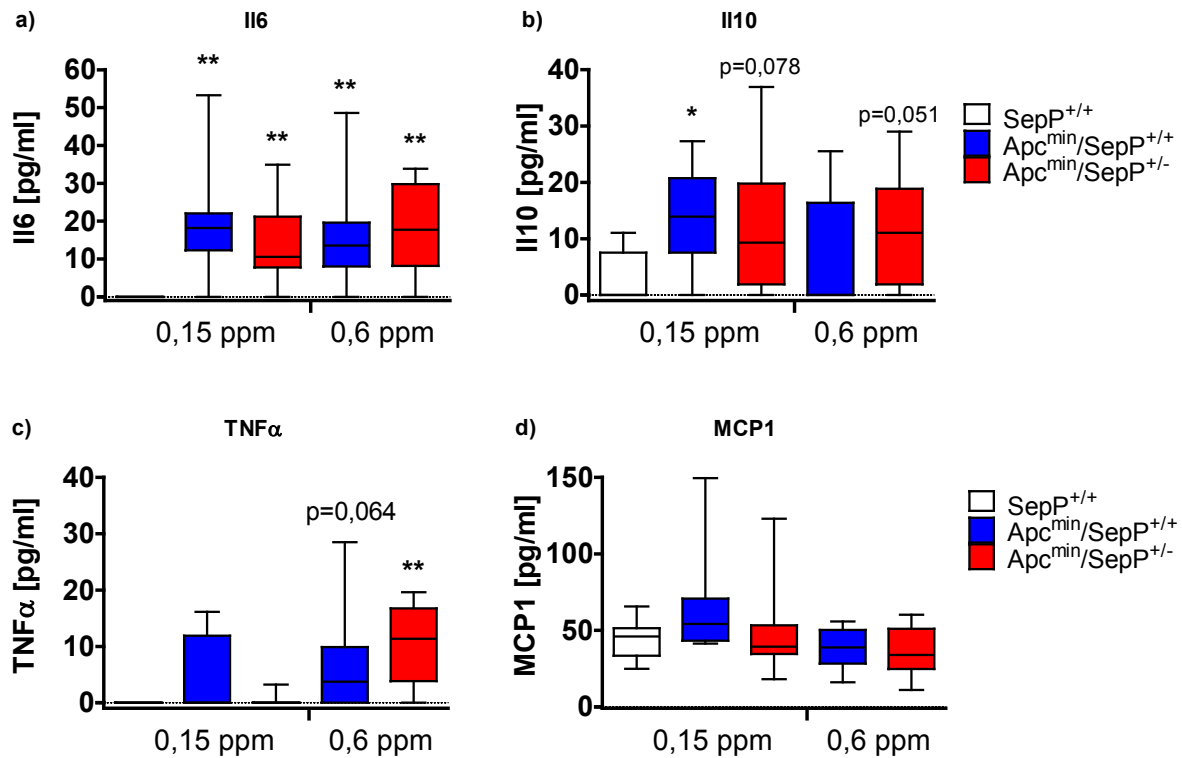


**Abbildung 45: Quantitative Analyse der Mastzellinvasion bei transgenen Versuchstieren.** (a) Der Grad der Einwanderung von Mastzellen ist für die transgenen Versuchstiere unabhängig vom Selen im Futter und vom murinen *SepP*-Genotyp. (b) Ein Zusammenhang zur plasmatischen Selenversorgung, wie für nicht-transgene Tiere, konnte nicht bestätigt werden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD für positiv gefärbte Zellen/mm<sup>2</sup> (T-Test; n = 8-10).

### 3.2.8 Zytokinkonzentrationen im Serum von *hSEPP/Apc<sup>min</sup>*-Tieren

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Serum der transgenen Versuchsgruppen ergaben Unterschiede zu den nicht-transgenen Tieren. Die Werte für MCP1 lagen für alle Versuchsbedingungen auf einem vergleichbar, unveränderten Niveau (Abb. 46 d). Die Serumspiegel von TNF $\alpha$  waren hohen interindividuellen Schwankungen unterworfen, lagen jedoch über dem Niveau der gesunden Kontrolltiere. Diese Tendenz war besonders bei erhöhter Selenversorgung ausgeprägt. Die Konzentrationen von Interleukin 6 waren in allen Behandlungsgruppen deutlich und signifikant erhöht (Abb. 46 a), jedoch ohne den Genotypbedingten Abweichungen der nicht-transgenen Tiere zu unterliegen. Die Serumspiegel von

Il10 waren in den erkrankten Tieren erhöht. Signifikant war dieser Effekt bei wildtypischen Mäusen, die eine adäquate Selendiät erhielten (Abb. 46 b). Die Gegenüberstellung der unterschiedlichen Versuchsgruppen ergab keine behandlungsbedingten Effekte.



**Abbildung 46: Konzentrationen verschiedener Zytokine im Serum von hSEPP/Apc<sup>min</sup>-Tieren.** Dargestellt sind die jeweiligen Konzentrationen als Boxplots. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (SepP<sup>+/+</sup>; 0,15 ppm Se) (Mann-Whitney-U Test; \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;  $n = 7-9$ ).

## 4 Diskussion

Die Kernfrage der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung von Auswirkungen einer gestörten Selenversorgung auf die Tumorigenese (Initiation und Progression) unter Verwendung der Apc<sup>min</sup>-Maus als Modellorganismus für den humanen Darmkrebs.

Krebserkrankungen stellen mit einer Anzahl von 7,6 Millionen Toten (2008, ca. 13% bezogen auf die Gesamtsterberate) eine der führenden krankheitsbedingten Todesursachen weltweit dar. Mit 610 000 Toten liegt Darmkrebs hierbei auf Platz 4 in der Rangliste krebsbedingter Sterblichkeit (WHO, 2011). Der Stellenwert von Selen in Bezug auf die protektive sowie therapeutische Wirkung bei Krebserkrankungen ist bis zum heutigen Zeitpunkt umstritten, sein essentieller Charakter als Spurenelement ist jedoch allgemein anerkannt. Epidemiologische und tierexperimentelle Arbeiten weisen im Fall von Lungen-, Prostata- und Darmkrebs auf einen positiven Zusammenhang zwischen dem Grad der nutritiven Selenversorgung und der Schwere der Krebserkrankung hin (Brinkman et al., 2006, Reid et al., 2008) (Abb. 47). Neben der ausreichenden Versorgung mit Selen über die Nahrung ist für die Bioverfügbarkeit und die Wirkungsentfaltung im Zielgewebe eine intakte Expression von Selenoproteinen unabdingbar. Mehrere Studien zu SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) in Selenoprotein Genen zeigen eine Abhängigkeit des allgemeinen Selenstatus von der genetischen Prädisposition für Krebserkrankungen (Meplan et al., 2007). Ebenso werden diese SNPs mit einem erhöhten Risiko an Krebs zu erkranken in Verbindung gebracht (Chen et al., 2011, Peters et al., 2008, Sutherland et al., 2010). Bei einer detaillierten Analyse von Kandidaten zeigten sich unter den Selenoproteinen SNPs in den Genen von TXNRD1 und SEPP als signifikant mit der Entwicklung großer Darmtumore assoziiert (Peters et al., 2008).



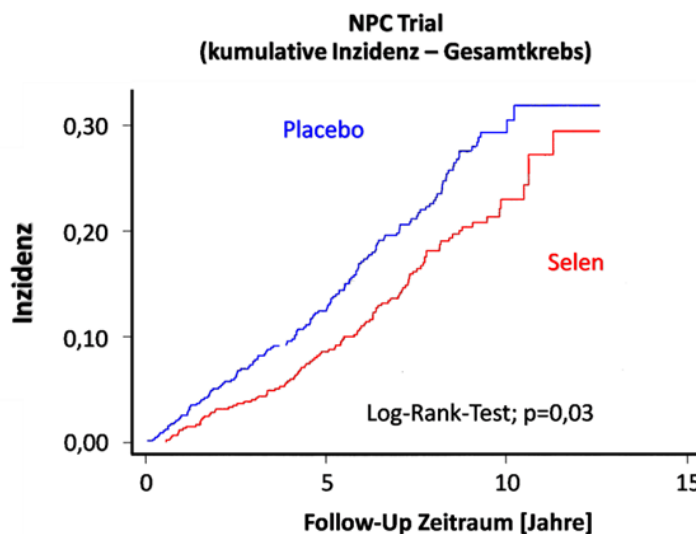


Abbildung 47: Einfluss einer verbesserten Selenversorgung auf die kumulative Inzidenz aller Krebserkrankungen im Rahmen des NPC-Trials (Duffield-Lillico et al., 2002).

Eine Selensupplementation zeigte im Rahmen dieser Studie insbesondere signifikante Effekte auf die Prostatakrebs- sowie die Gesamtkrebsinzidenz bei männlichen Patienten (Duffield-Lillico et al., 2002) (Abb. 47).

Eine Schlüsselrolle des Selentransports über den Blutkreislauf nimmt Selenoprotein P ein. Als Modellorganismus zur *in vivo* Untersuchung der einzelnen Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit, wurde die in der Arbeitsgruppe generierte SepP<sup>+/-</sup>-Maus herangezogen. Durch den Allelverlust kommt es bei heterozygoten Tieren zu einem einheitlichen und reproduzierbaren Abfall des Serum-Selenspiegels auf ca. 60% im Vergleich zu den Werten wildtypischer Tiere (Schomburg et al., 2003). Dieser Abfall spiegelt den Status einer Se-Mangelversorgung wider, wie sie bei den meisten Europäern vorliegt. Ebenso kann man diesen SepP-Mangel in heterozygoten Tieren als Modell für einen unvorteilhaften Genotyp von SEPP sehen, da bestimmte SNPs in SEPP mit reduzierten Selenserumkonzentrationen einhergehen und eine reduzierte SEPP-Expression widerspiegeln.

Durch die zentrale Rolle von SepP für den Selenmetabolismus und den Selenstatus führt dies zusätzlich zu einer Verminderung der lokalen Expression einzelner Selenoenzyme in den nachgeschalteten Organen. Um die Selen-Effekte auf die intestinale Tumorgenese genauer zu beleuchten, wurden die Tiere mit dem Apc<sup>min</sup>-Zuchtstamm verkreuzt. Diese Zuchtlinie entwickelt, bedingt durch eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC, exophytische intestinale Adenome und ist als Darmkrebsmodell etabliert. Ein hochfrequentes Auftreten solcher Mutationen im APC Gen, insbesondere bei humanen intestinalen Adenomen und

Karzinomen, konnte in vielen entsprechenden Studien nachgewiesen werden und schafft somit eine plausible Grundlage zur Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen (Gryfe et al., 1997).

Da der Phänotyp der SepP<sup>-/-</sup>-Maus durch teilweise drastische Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Versuchstiere gekennzeichnet ist (Ataxie, neuronale Dysfunktion), wurde auf eine entsprechende Ausweitung der Versuchsgruppen auf diesen Genotyp verzichtet. Vorarbeiten zeigten zusätzlich, dass die Einkreuzung des Apc<sup>min</sup>-Stammes zu einer frühzeitigen Verschlechterung des Allgemeinzustandes dieser Versuchstiere ab einem Zeitpunkt von ca. 50 Tagen führt. Dieser Umstand machte eine Tötung der Tiere zur Vermeidung weiteren Leidens unabdingbar. Eine vorzeitige Auswertung der Tumorlast erschien nicht plausibel, da die neoplastischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt weder makroskopisch noch mikroskopisch kaum fassbar und zu den hier gezeigten Ergebnissen vergleichbar sind.

Die Analyse von Genotyp-bedingten Effekten (SepP<sup>+/+</sup> vs. SepP<sup>+/-</sup>) erfolgte auf dem Hintergrund zweier unterschiedlicher Fütterungsstrategien. Einerseits bei einem Selengehalt von 0,15 ppm im Trockenfutter und in einem erweiterten Versuchsansatz bei einem Nahrungs-Selengehalt von 0,6 ppm. Die Auswahl der Konzentration für die als „adäquat“ bezeichnete Selenversorgung (0,15 ppm Se) orientierte sich an den empfohlenen humanen Tagesdosen (55 µg für Frauen; 70 µg für Männer) und unter der Annahme eines durchschnittlichen Körpergewichtes der Versuchstiere von 25 g. Der Selengehalt 0,6 ppm entspricht dem 4-fachen dieser Menge und liegt in der Größenordnung gegenwärtiger Se-Präventionsansätze. Die gewünschten Konzentrationen wurden durch definierte Beimischung von Natriumselenit zu einem selenarmen Basisfutter erreicht und durch analytische TXRF-Messungen verifiziert.

Das anorganische Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> gelangt über passive Resorption im Intestinaltrakt in den Blutkreislauf. Die größte Resorptionsrate und auch Akkumulation von Selen im Dünndarm zeigt sich in den distalen Segmenten (Ileum) (Wolffram et al., 1985). Diese Darmabschnitte zeigten auch im Versuch eine verstärkte Responsivität auf die nutritive Selenversorgung und reagierten am stärksten in Bezug auf eine veränderte Tumorigenese bei erhöhter Selenadministration. Ein entsprechendes Akkumulationsmuster des Selen im intakten Darmgewebe konnte jedoch nicht beobachtet werden. Natriumselenit steht nach seiner Umsetzung zu Dihydrogenselenid (H<sub>2</sub>Se) unmittelbar für die Synthese von Sec-geladener tRNA[Ser]Sec und nachfolgend von SepP zur Verfügung, und der Einbau in SepP erfolgt bis zum Erreichen einer maximalen Expression. Nicht metabolisiertes anorganisches Selen wird

wieder ausgeschieden. Im Gegensatz zum ungerichteten und unlimitierten Einbau von SeMet ist somit eine direkte Abhängigkeit zum SepP-Metabolismus gegeben. Dieser enge Zusammenhang spiegelt sich auch in den Serum-Selenspiegeln der Versuchstiere wider. Die heterozygoten Tiere wiesen durchgehend eine Reduktion der Selenkonzentrationen um 40-45% auf. Bis zu 95% des Selens im Serum lag proteingebunden vor. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in den Serumselenkonzentrationen bei einer Selenit-basierten Supplementation durch Effekte auf die Selenoproteinbiosynthese und SepP-Konzentrationen verursacht werden, und das verabreichte Selen nur zu einem sehr geringen Ausmaß unspezifisch zur Serumselenkonzentration beiträgt. Gegenüber SeMet-basierten Supplementationsstudien ist somit bei der Beurteilung möglicher antikarzinogener Wirkmechanismen primär von Änderungen im Selenoproteinmetabolismus auszugehen. Bei einer SeMet-basierten Supplementation müssten hier zusätzlich noch Effekte der SeMet-Metabolite wie z.B. Methylselenol betrachtet und diskutiert werden (Ip und Ganther, 1990).

#### **4.1 Effekte auf die intestinale Tumorigenese**

##### **4.1.1 Nutritive Selenversorgung und Tumorigenese**

Unabhängig vom SepP-Genotyp konnte durch die Steigerung des Se-Gehalts in der Nahrung eine Reduktion der Tumoranzahl sowie der Tumorgroße erzielt werden. Vergleichbare Ergebnisse zum chemopräventiven Charakter von Selen konnten bereits unter Verwendung des gleichen Tiermodells für Selen-angereicherten Broccoli (Davis et al., 2002) und eine organischen Selenverbindung (p-XSC) (Rao et al., 2000) gezeigt werden und stehen im Einklang mit den Resultaten zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Studien (Jackson und Combs, 2008).

Als Marker für den allgemeinen Selenstatus ist die Bestimmung der SEPP-Konzentration im Serum anerkannt und zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit als weitaus aussagekräftiger, als die Bestimmung der plasmatischen Gpx-Aktivität. Im Gegensatz zum Serum-Selenspiegel war die Enzymaktivität in den Versuchstieren weitgehend unbeeinflusst von einer verminderten SepP-Expression. Einzig in den heterozygoten Tieren war bei einer erhöhten diätetischen Selenversorgung eine signifikant gesteigerte Aktivität zu beobachten, die sich auf eine erhöhte diätetische Selenversorgung zurückführen lässt. Vielfach wurde bereits eine Hierarchie unter den Selenoproteinen beschrieben, die bei limitierter Selenversorgung zur bevorzugten Expression essentieller Selenoproteine führt (Cohen et al., 1985, Schomburg und Schweizer, 2009, Schweizer et al., 2004, Wingler et al., 1999). Die

Selenverfügbarkeit in den unterschiedlichen Versuchsgruppen scheint in diesem Zusammenhang ausreichend, um für alle Versuchsbedingungen eine maximale Expression der plasmatischen Glutathion-Peroxidase (Gpx3) zu gewährleisten. Gleiches kann auch für die SepP-Expression in den Versuchsgruppen mit einheitlichem genetischen Hintergrund vorausgesetzt werden. Die beobachteten Effekte einer gesteigerten Selenaufnahme auf die Tumorigenese müssen daher wohl eher auf Unterschiede in der Expression intrazellulärer Selenoproteine zurückgeführt werden, da einige Selenoproteine stärker von einer optimalen Se-Versorgung durch SepP abhängig sind. Durch ihre antioxidativen Funktionen tragen Selenoproteine z.B. zum Abbau von  $H_2O_2$  und Lipidhydroperoxiden bei, vermindern die Bildung von ROS und Malondialdehyd (MDA) und haben Einfluss auf Redox-regulierte Signalwege. Für SeMet wurde eine modulierende Aktivität auf p53 nachgewiesen und somit ein Einfluss auf die Reparatur von DNA-Schäden (Seo et al., 2002). Ein weiterer anti-karzinogener Effekt von Selen würde sich hierbei durch die verminderte p53-abhängige Expression von VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und die damit einhergehende verminderte Neovaskularisierung im Tumorgewebe ergeben (Dameron et al., 1994). Zahlreiche Studien belegen insbesondere die Wirkung hoher Selenkonzentrationen auf wachstumsmodulierende Faktoren. Die Reaktion von Selenit mit reduziertem Glutathion (GSH) führt zu vermehrter Bildung von ROS, die wiederum DNA-Schäden hervorrufen. Dies führt z.B. zur Induktion von Caspase-unabhängiger Apoptose in Gebärmutterhalskrebszellen (Rudolf et al., 2008). Vor allem hohe Selenit-Dosen zeigen im Vergleich zu anderen Selenformen ein signifikant höheres Potential DNA-Schäden hervorzurufen (Letavayova et al., 2008). Neuere Studien zeigen auch einen entscheidenden Einfluss auf Mechanismen, die einer Tumorentstehung schon in frühen Phasen entgegenwirken. Die Gabe von Natriumselenit stimuliert konzentrationsabhängig die ATM- (*ataxia telangiectasia mutated*) vermittelte DNA-Reparatur (Qi et al., 2010) und die Zellseneszenz in humanen Darmkrebszellen (Wu et al., 2010). Vor allem die Eigenschaft zur Induktion von Seneszenz liefert hier einen effizienten Mechanismus für einen Selen-vermittelten protektiven Effekt gegenüber Krebserkrankungen. Ob dieser auch Anteil trägt an den beobachteten Effekten auf die Tumorigenese im Apc<sup>min</sup>-Mausmodell sollte über weitere Experimente genauer untersucht werden.

Im Rahmen des geförderten Projektes wurde auch die Strategie einer Hoch-Selen Therapie ab Tag 60 verfolgt, um die Auswirkungen von Selen auf eine bereits erfolgte Tumoranlage zu untersuchen. Dieser Ansatz ergab, im Gegenteil zur Hoch-Selen Gabe ab Tag 21, keine bzw. eher negative Erfolge auf die Tumorverteilung. Dies weist verstärkt auf einen eher

protektiven Effekt bezüglich der Tumorentstehung hin, unterstützt aber nicht die Hypothesen zum therapeutischen Potential von Selenit für bereits im Wachstum begriffene Tumore des Darms.

#### 4.1.2 Effekte eines veränderten *SepP*-abhängigen Se-Metabolismus

Die morphologische Auswertung (Anzahl und Fläche) der Tumore des Intestinaltraktes im verwendeten Mausmodell liefert ebenso einen eindeutigen Zusammenhang zwischen gestörtem Se-Metabolismus, bedingt durch einen veränderten *SepP*-Genotyp, und dem Grad der intestinalen Tumorigenese.

Wie bereits eingangs beschrieben führt die Inaktivierung eines *SepP*-Allels zu einer drastischen Reduktion der plasmatischen Selenkonzentrationen und bestätigt somit die grundsätzliche Arbeitshypothese. Der eindeutige Zusammenhang zwischen plasmatischer Selen- und SEPP-Konzentration konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gut belegt werden (Hoeflich et al., 2010). Aus Humanstudien konnte ein Zusammenhang zwischen SEPP-Gehalt im Serum und der Ausprägung von Krebserkrankungen abgeleitet werden. Im Fall von Prostatakrebs sind die SEPP-Konzentrationen im Serum erkrankter Personen deutlich niedriger als bei Vergleichsprobanden, korrelieren mit dem Krebsstadium und einer schlechteren Prognose (Meyer et al., 2009). Ob die veränderten Werte für den SEPP-Gehalt nun die Unterschiede in der Schwere der Erkrankung bedingen oder als Resultat einzuordnen sind, ist aufgrund der Datenlage nicht zu klären. Durch eine Subkohorten-Analyse der EPIC-Studie, bei der die Parameter des Selenstatus und der Genotypen mit einbezogen wurden, festigte sich jedoch die Annahme einer genetischen Prädisposition in Bezug auf das Prostatakrebsrisiko (Steinbrecher et al., 2010). Hierbei könnte SEPP über seine Funktion als protektives Protein eine fortschreitende Entartung von Prostatazellen im Tumorgewebe verhindern (Gonzalez-Moreno et al., 2010). Überdies zeigen unsere Analysen zur SEPP-Konzentration im Serum und dem Stadium von kleinzelligem Nierenkarzinom, dass die SEPP-Konzentrationen wiederum mit dem Krebsstadium und der Überlebenswahrscheinlichkeit korrelieren (Meyer et al., 2011).

Bei adäquater Selenversorgung führt der Allelverlust im *SepP*-Gen zu einer verringerten Tumormasse, die sich vorrangig in einer geringeren Gesamtumflächung manifestiert. Durch die Verschiebung im quantitativen Tumorspektrum hin zur Ausprägung großflächiger, unter einer gleichzeitigen Reduktion kleinerer, Adenome scheint eine verstärkte Progression bei heterozygoten *Apc*<sup>min</sup>-Tieren durchaus plausibel. Durch die gewählten Versuchsbedingungen

kann sie aber nicht von einer früheren Tumorinitiation abgegrenzt werden. Eine Steigerung der Selensupplementation in den entsprechenden Versuchsgruppen geht mit einer Abschwächung dieser Tendenz einher. Generell kommt es hierbei zum vermehrten Auftreten kleinerer Adenome, Unterschiede in den Verteilungsmustern größerer Adenome (> 2mm) bleiben aus.

Histologisch zeigen sich die Adenome heterozygoter Tiere bei gleicher Größe und adäquater Selenversorgung schlechter differenziert und weisen somit ebenfalls auf eine verstärkte Progression bei verringerter *SepP*-Expression hin. Eine erhöhte Selenversorgung kann diesen Effekt vollkommen aufheben und geht mit abgeschwächten Unterschieden in der Tumorverteilung unter diesen Versuchsbedingungen einher. Weitere Klarheit über den Zusammenhang von Tumorinitiation und -Progression in Abhängigkeit vom zugrundeliegenden *SepP*-Genotyp könnte über eine zeitliche Auflösung der quantitativen Tumoranalyse erzielt werden, die jedoch mit einer erheblichen Ausweitung des Versuches und der Anzahl an Versuchstieren verbunden wäre.

Bezogen auf die Frage, ob ein negativer *SepP*-Genotyp über eine verstärkte Selensupplementation zu kompensieren ist, lässt sich anhand der Datenlage eine klare Aussage treffen. Unabhängig vom *SepP*-Genotyp profitierten die Versuchstiere signifikant von einer Selen-Supplementation. Sowohl Tumoranzahl als auch Gesamttumorfläche waren deutlich verringert. Bei der Gegenüberstellung adäquat versorgter *Apc<sup>min</sup>*-Tiere und supplementierter heterozygoter *Apc<sup>min</sup>*-Tieren ergibt sich nicht nur eine Kompensation des negativen Genotyp-bedingten Effektes, die erhöhte Selengabe überlagert diesen sogar und resultiert in einer deutlich positiveren Tumorverteilung hin zu kleineren Adenomen (vgl Abb. 17). Durch die Erkenntnisse zur Hoch-Selen-Therapie ab Tag P60 muss hierzu jedoch einschränkend festgehalten werden, dass dieser positive Effekt nur bei erfolgter Supplementation vor der Tumorinitiation zu erreichen ist. Zu einem späteren Zeitpunkt wirkt eine solche Supplementation nicht mehr positiv sondern eher tumorwachstumsfördernd.

## 4.2 Genexpression im Tumorgewebe

Mehrfach belegt ist auch eine konsistent verminderte *SEPP*-mRNA Expression in humanen Darmkrebstumoren, wobei ein vergleichbares Expressionsmuster für *GPX2*-Transkripte nicht in allen untersuchten Geweben bestätigt werden konnte (Al-Taie et al., 2004).

Die lokale Expression von Selenoproteinen im Gewebe unterliegt einer starken Limitierung über die Selenversorgung. Die Transkriptomanalyse mittels Genchip lieferte jedoch keinerlei

Anzeichen für eine relevant abweichende Regulation von Genen im Tumorgewebe der einzelnen Versuchsgruppen. Die Transkripte von Selenoproteinen und Markern für Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese sowie Inflammation wiesen nahezu identische Expressionsmuster auf.

Ein zugrundeliegendes methodisches Problem für das Ausbleiben von Effekten auf die versuchsbedingte Genexpression könnte die Gewinnung des Tumormaterials für die RNA-Extraktion darstellen. Für die Aufarbeitung konnten größtenteils Gewebe verwendet werden, welche sich gut von dem umliegenden gesunden Gewebe abgrenzen ließen. Das ausgewählte Material musste zusätzlich über die unterschiedlichen Tumorgößen hinweg vereint werden und ließ somit keine Aussagen über Expressionsänderungen in den einzelnen Stadien der Tumorentwicklung zu.

Die Förderung der Angiogenese ist von entscheidender Bedeutung, um ein Tumorwachstum über ein Volumen von 1 mm<sup>3</sup> hinaus zu gewährleisten (Ribatti et al., 2004). Gerade die frühen Stadien der Tumorentwicklung würden somit einen größeren Erkenntnisgewinn hinsichtlich Angiogenese-modulierender Effekte erwarten lassen, treten jedoch aufgrund des geringen prozentualen Anteils am Gewebepool in den Hintergrund. Setzt man voraus, dass die Initiation aller neoplastischen Veränderungen von einem Funktionsverlust des zweiten *Apc*-Allels abzuleiten sind, so sind die vergleichbaren Expressionsmuster der einzelnen Behandlungsgruppen nicht überraschend, da die untersuchten Adenome eher den späten Stadien der Tumorentwicklung zuzuordnen sind und als qualitativ gleichwertig anzusehen sind. Für weitere Untersuchungen wäre eine differentielle Betrachtung hinsichtlich der einzelnen Progressionsstadien in diesem Zusammenhang vielversprechend.

Zusätzlich zu den Genchip-Analysen wurde sowohl die Expression von Kandidatengenen im Tumorgewebe als auch im Vergleich zum intakten Darmgewebe mittels Real-Time PCR untersucht. Unterschiede, die auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen sind, ergaben nur für die *Dio3* Expression und resultierten in einer konsistent und drastisch erhöhten Expression im Tumorgewebe. Wenn auch nicht durch den Genotyp beeinflusst, so war die Expression dieses Selenoenzyms vorwiegend in den nicht-supplementierten Versuchsgruppen deutlich gesteigert. Eine verstärkte Expression in Krebszellen ist bereits mehrfach beschrieben und wird als proliferationsfördernd angesehen (Dentice et al., 2009). Der zugrunde liegende Mechanismus hierfür ist dennoch bis zum heutigen Zeitpunkt unklar. Neben der verminderten *Dio1*-Expression deutet dies jedoch auf eine wichtige Rolle der Dejodasen in der Tumorentwicklung hin, wobei die Verifizierung dieser Ergebnisse z.B. durch Aktivitätsbestimmungen noch aussteht. Überaus interessant wäre es in diesem Fall, den

Einfluss einer spezifischen Dio3 Inhibition auf die vorliegenden protektiven Effekte zu untersuchen.

Gene des Wnt-Signalweges ( $\beta$ -Catenin, Tcf) und das Zielgen *c-myc* waren im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert. Die Transkripte mehrerer Selenoproteine waren krankheitsbedingt reguliert. Für die Transkriptmengen von *SepP* und *Gpx2* bestätigten sich die bekannten Effekte auf die Expression in Tumoren. Die gesteigerte *Gpx2*-Expression ist durch die Eigenschaft der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Promotoraktivierung dieses Gens plausibel (Kipp et al., 2007). Ein Zusammenhang zwischen Wnt-Signalweg und der Regulation von Selenoproteinen ist bereits bekannt (Kipp et al., 2009) und zeigt sich in dieser Arbeit für *SeIH* und *SeIM*, nicht aber für *SeIW*.

Neben der Regulation der Transkriptmengen haben prä- und posttranskriptionelle Mechanismen Einfluss auf die Expression von Selenoproteinen (Riese et al., 2006, Sun et al., 2011, Ufer et al., 2008). Hierbei zeigen sich Unterschiede sowohl abhängig vom Geschlecht als auch vom untersuchten Gewebe (Riese et al., 2006). Bezogen auf das allgemeine Risiko, an Krebs zu erkranken, profitieren insbesondere Männer von einem optimalen Selenstatus (Waters et al., 2004). Entsprechende Unterschiede in den mRNA-Expressionsmustern und Regulationen in RNA-Präparationen aus männlichen und weiblichen Versuchstieren traten im untersuchten Tumorgewebe jedoch nicht auf. Einen möglichen Effekt, auch hinsichtlich der Versuchsbedingungen, auf Protein-Ebene kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Aufnahme von SEPP ins Zielgewebe wird vorwiegend über zwei Mitglieder der Lipoproteinrezeptor- Related Protein (LRP) Familie gewährleistet. In den Tumoren aller *Apc<sup>min</sup>*-Tiere waren die Transkriptmengen von *Lrp8* signifikant erhöht. Für eine verstärkte Rezeptor-vermittelte Aufnahme von *SepP* sprechen auch die zum Teil signifikant erhöhten Selenkonzentrationen im Tumorgewebe. Für Brust- (Charalabopoulos et al., 2006) und Magenkrebs (Charalabopoulos et al., 2009) konnte eine entsprechende Akkumulation von Selen im Tumorgewebe bereits nachgewiesen werden. Im Rahmen von Zellkulturexperimenten ist eine ausreichende Gabe von Selen über das Medium entscheidend für ein optimales Zellwachstum, bedingt durch seine essentielle Rolle in der Zellteilung und DNA-Synthese (Arner und Holmgren, 2000). Die vorliegende Akkumulation im Tumorgewebe müsste in diesem Zusammenhang als wachstumsfördernd angesehen werden. Geht man davon aus, dass gegensätzlich zu einer protektiven Wirkung auf die Tumoringenition die Anreicherung von Selen im Tumorgewebe somit das Wachstum fördert,



würde die Inhibition der Rezeptor-vermittelten Selenaufnahme einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt darstellen.

### 4.3 Einfluss auf die krankheitsbedingte Immunantwort

Erste Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Inflammation und Krebs lieferte bereits Rudolf Virchow im Jahr 1863, als er Leukozyten im Tumorgewebe beschrieb (Virchow, 1865). Getrieben durch diese Erkenntnis kam er zu der Hypothese, dass Krebs vor allem an Stellen chronischer Entzündung entsteht. Tatsächlich ergibt sich für Krankheitsbilder, die mit chronischer Entzündung einhergehen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Barrett-Syndrom), ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Krebs in den betroffenen Organen. Experimentell zeigt sich in der Maus eine Förderung des Tumorwachstums, der Angiogenese und Metastasierung bei Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Entzündung (Harmey et al., 2002).

Die deutlichen Unterschiede in der Tumorquantität und -Verteilung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden deshalb auf eine unterschiedlich ausfallende Immunantwort hin untersucht. Alle *Apc<sup>min</sup>*-Tiere zeigten eine starke Hochregulation inflammatorischer Marker wie *Cox2*, *Tnfa*, *Il6* und *Mt2*.

Zur Entstehung klinisch relevanter Tumore ist, neben der Aktivierung von Onkogenen und der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die Tumor-Stroma Interaktion wichtig. Das auch als „Mikroumgebung“ bezeichnete Stroma beinhaltet eine Vielzahl verschiedener Zelltypen (z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, Granulozyten, B- und T-Lymphozyten sowie natürliche Killerzellen). Es wird mittlerweile als integraler Bestandteil des Tumorgewebes angesehen, der durch seine Interaktion mit Tumorzellen die Tumorprogression fördern kann (Coussens und Werb, 2002, Hanahan und Weinberg, 2011). Sowohl Tumorzellen als auch Zellen der Mikroumgebung reagieren auf spezielle Bedingungen des Tumormilieus (z.B. Hypoxie) mit der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die zur Rekrutierung verschiedener Immunzellen führt.

Die rekrutierten Monozyten und Makrophagen tragen hauptsächlich zu einer gesteigerten Expression von COX2 und auch TNF $\alpha$  bei (Prescott und Fitzpatrick, 2000). Eine Steigerung der entsprechenden Transkriptmengen zeigte sich auch in allen krebstragenden Versuchsgruppen. Als weiterer Teilaspekt wurde innerhalb dieses Projektes auch die Auswirkung einer COX2-Inhibition auf die Tumorigenese untersucht. Die Verabreichung des selektiven COX2-Hemmers (Sulindac) ab Tag 60, in Kombination mit einer adäquaten Selenversorgung über den gesamten Versuchszeitraum, führte nicht zu dem erwartet

positiven Effekt (Endermann, eingereicht 2012). Vergleichbare Studien ergeben, dass entsprechende Therapieansätze für FAP-Patienten (Labayle et al., 1991, Waddell und Loughry, 1983) und auch in tierexperimentellen Studien durchaus erfolgreich sein können (Boolbol et al., 1996, Chiu et al., 1997). Durch die Langzeit-Gabe von Sulindac kann es jedoch zu einer Resistenzbildung kommen, die nach anfänglicher Reduktion der Tumorzahlen zu einem verstärkten Tumorwachstum führt (Carothers et al., 2006). Unter diesen Bedingungen erscheinen auch die von uns diesbezüglich gewonnenen Ergebnisse plausibel und valide.

Insbesondere Makrophagen spielen auch eine Rolle bei der Entstehung entzündungsbedingter neoplastischer Veränderungen (Pollard, 2004). Durch vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Verbindungen kommt es zur DNA-Schädigung und Mutagenese in Epithelzellen (Fulton et al., 1984, Maeda und Akaike, 1998). Peritoneale Makrophagen von Ratten, die unter Selen-defizienten Bedingungen gehalten wurden, wiesen eine verstärkte Produktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) auf (Parnham et al., 1983), und Granulozyten konnten  $H_2O_2$  aufgrund verringerter GPX-Aktivität nicht metabolisieren (Baker und Cohen, 1984). In Zellkulturexperimenten beeinflusst eine Selensupplementation über den Arachidonsäure-Metabolismus die Verschiebung hin zu Makrophagen mit M2-Phänotyp (Vunta et al., 2007). Im Gegensatz zum M1-Phänotyp zeichnen sich diese alternativ aktivierten Makrophagen durch die Produktion entzündungshemmender Zytokine aus. Die Gabe supraphysiologischer Selenit-Konzentrationen führt *in vitro* zu einer verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Prabhu et al., 2002). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B fördert durch die Expression anti-apoptotischer Gene das Überleben präneoplastischer und maligner Zellen (Karin, 2006). Diese beschriebenen Mechanismen zeigen eher einen Einfluss auf initiale Ereignisse der Tumorentstehung und nicht auf das Tumorwachstum oder die Progression (Greten et al., 2004).

Auf eine Beeinflussung der Tumorinitiation lässt sich jedoch nur durch die reduzierte Tumoranzahl in den supplementierten Versuchsgruppen schließen, die aber auch über die beschriebenen Selen-abhängigen Effekte, wie z.B. die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 (Seo et al., 2002) oder die p53-bedingte Aktivierung der pro-apoptotischen Caspasen 8 und 9 erklärt werden können (Jiang et al., 2004).

Motiviert durch die Erkenntnisse früherer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde, in Bezug auf regulatorische Ereignisse in der Immunantwort, ein besonderer Fokus auf die Rolle der Mastzellinvasion ins Tumorgewebe gelegt. Mastzell-spezifische Gene (*Mcpt1*, *Mcpt2*, *Cpa3*, *c-Kit*) waren im Tumorgewebe aller Versuchsgruppen signifikant verstärkt

exprimiert. Ein Zusammenhang zum Selenmetabolismus konnte, zumindest auf Ebene der Genexpression, jedoch nicht hergestellt werden. Dennoch ist in den Adenomen heterozygoter Tiere eine signifikant höhere Invasion von Mastzellen festzustellen. Dieses Ergebnis ist unabhängig von der Tumorgroße, da sich die Effekte auch unter Bezug auf die Gesamtfläche ergeben.

Die Akkumulation von Mastzellen in Verbindung mit einem gesteigerten Invasionspotential und beschleunigtem Tumorwachstum konnte bereits für zahlreiche solide und hämatologische Krebsformen gezeigt werden (Ribatti et al., 2001). Die meisten Darmtumore entwickeln sich aus adenomatösen Polypen, für die eine Invasion pro-inflammatorischer Mastzellen sowohl im murinen Tiermodell (Gounaris et al., 2007) als auch beim Menschen (Gulubova und Vlaykova, 2009) nachgewiesen wurde. Eine positive Korrelation der Mastzelldichte mit einer verbesserten Prognose ergibt sich hierbei sowohl für Brustkrebs (Aaltomaa et al., 1993, Dabiri et al., 2004) als auch für Lungenkrebs (Welsh et al., 2005). Bei Darmkrebserkrankungen (Fisher et al., 1989) oder dem Hodgkin Lymphom (Molin et al., 2002) ist diese Korrelation invers und führt somit zu einer schlechteren Prognose für den Patienten. Lokalisiert sind Mastzellen überwiegend in den peripheren Tumorregionen mit höherem Invasionspotential (Coussens et al., 1999), was sich durch die Auswertung der histologischen Färbungen für alle Versuchsgruppen bestätigte.

Als charakteristisches Zellorganell verfügen Mastzellen über Granula, die bei Aktivierung ihren Inhalt exkretorisch freisetzen. Dies kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Einerseits durch massive, sog. anaphylaktische Degranulation, wie sie bei Typ-1-Allergien auftritt, oder durch partielle Degranulation, die eher im Rahmen chronischer Inflammation zu finden ist (Saito, 2008). Da sie sich von hämatopoetischen Stammzellen ableiten lassen, zirkulieren ihre Vorläuferzellen im Blutkreislauf, migrieren ins Zielgewebe und reifen dort erst zu Mastzellen heran. Von entscheidender Bedeutung für diese Abläufe ist der Stammzellfaktor (SCF), der auch den Liganden für den CD117- (c-Kit) Rezeptor darstellt. Seine Sekretion erfolgt sowohl durch Stroma- als auch durch Tumorzellen selbst und fördert das Tumorwachstum (Kitamura und Hirota, 2004, Zhang et al., 2000). Sowohl der Knockdown von SCF als auch anti-c-Kit Antikörper resultierten in einer Inhibierung der Mastzell-Infiltration und dem Tumorwachstum im Mausmodell (Djokovic et al., 2010).

Im Bindegewebe sind Mastzellen in der Nähe von Blutgefäßen und Nerven lokalisiert, was ihnen eine besondere Stellung in Prozessen wie Wundheilung, Fibrose und Angiogenese zukommen lässt (Weller et al., 2006). Die Neubildung von Gefäßen ist nicht nur bei physiologischen Prozessen, wie z.B. der Embryogenese, sondern auch unter gewissen

pathophysiologischen Bedingungen unabdingbar und ermöglicht das Größenwachstum von Tumoren über eine Dimension von 1-2 mm<sup>3</sup> hinaus. Die Mastzellinvasion tritt noch vor dem Einsetzen der Gefäßneubildung ein und eine positive Korrelation beider Parameter konnte für Darm- (Nielsen et al., 1999), Brust- (Bowrey et al., 2000, Hartveit, 1981) und Gebärmutterhalskrebs (Graham und Graham, 1966) nachgewiesen werden.

Im vorliegenden Versuch weisen die heterozygoten Tiere bei adäquater Selenversorgung eine deutlich gesteigerte Mastzellichte auf. Ebenso ergibt die Auswertung der Tumorverteilung eine eindeutige Verschiebung hin zu größeren Tumoren bei adäquater Selenversorgung. Der Schnittpunkt beider Verteilungskurven entspricht dem erwähnten kritischen Tumorgrößenbereich und spricht für einen Genotyp-bedingten Einfluss auf das, durch verstärkte Angiogenese geförderte Tumorwachstum. Ein entsprechender Effekt bleibt in den Versuchsgruppen mit gesteigerter Selenversorgung aus. Diese bilden jedoch generell weniger Adenome aus, die somit auch zu einem geringen Anteil die kritische Tumorgröße zum Versuchsendpunkt erreichen (Abb. 48). Geht man bei der Verabreichung hoher Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>-Dosen zusätzlich von einem Effekt auf die Tumoringitiation aus, würde eine abschließende Betrachtung der Tumorverteilung bei einer verlängerten Versuchsdauer zeigen, ob sich die Mastzellinvasion auch unter diesen Versuchsbedingungen auswirkt. Für diese Annahme spricht auch die Aufhebung des Genotyp-bedingten Effektes auf den Entartungsgrad in den supplementierten Versuchsgruppen, der bei adäquater Selenversorgung signifikant vorliegt.

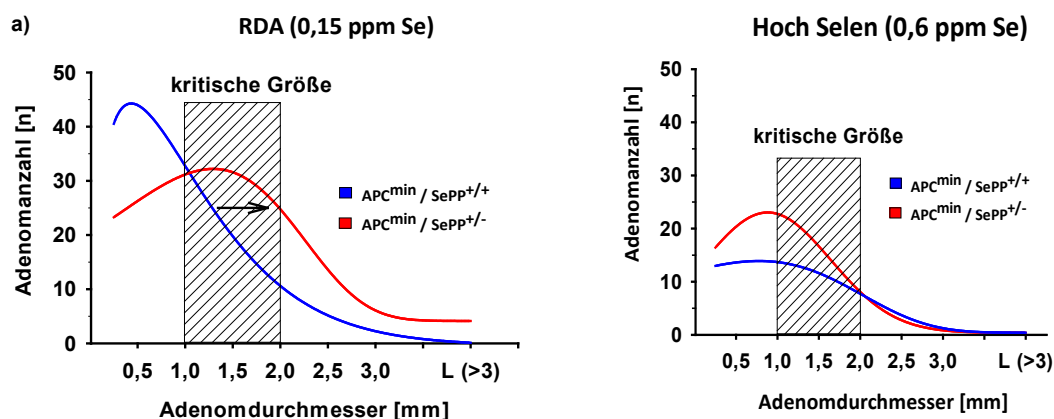


Abbildung 48: Unterschiede in der Genotyp-abhängigen Tumorverteilung der einzelnen Fütterungsstrategien.

Die Aktivierung von Mastzellen führt zu einer verstärkten Expression von Zytokinen (Il4, Il6, Il8, TNF $\alpha$ ), chemotaktischer Mediatoren sowie zur Freisetzung der Angiogenese fördernden Wachstumsfaktoren FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Liu et al., 2012, Squadrito und De Palma, 2011). Eine verstärkte Genexpression von Il6 und TNF $\alpha$  trat in allen Apc<sup>min</sup>-Tieren auf, steht jedoch nicht im Zusammenhang mit den Unterschieden in der Mastzellichte.

Die Freisetzung verschiedener Enzyme zum Abbau extrazellulärer Matrix (ECM) durch Mastzellen begünstigt die Neovaskularisierung und Metastasierung durch Spaltung und Modellierung der ECM (Lorentz, 2011). Eine Stimulation durch Selenit inhibiert in humanen Fibrosarkomzellen die Fähigkeit, an die Kollagenmatrix zu binden und hemmt die Expression von MMP2 und MMP9 (Yoon et al., 2001). Verschiedene Therapieansätze, die auf einer Inhibition der Angiogenese beruhen, wurden entwickelt, zeigen derzeit jedoch nur moderate Effekte bei der klinischen Anwendung (Cao, 2009).

Neben Mastzellen wird auch die Rolle regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang mit chronischer Inflammation und Tumorprogression kontrovers diskutiert. In Apc<sup>min</sup>-Tieren zeigt sich eine Regression intestinaler Adenome durch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Erdman et al., 2005). Unter inflammatorischen Bedingungen führt jedoch die Stimulation durch Il6 und Tgf $\beta$  zur Ausbildung des pro-inflammatorischen Th17-Phänotyps (Bettelli et al., 2006). Dieser fördert über die Freisetzung von Il17 wiederum das Tumorwachstum. Eine entsprechende Tumordinvasion von T-Zellen konnte, durch Färbung einzelner Schnittpräparate mit einem anti-CD3-Antikörper, in unseren Versuchen jedoch nicht nachgewiesen werden. Positiv gefärbte Zellen waren unabhängig von den Versuchsbedingungen vorwiegend in den Peyer'schen Plaques und auch im gesunden Gewebe lokalisiert.

Zusätzlich zu der Analyse lokaler versuchsbedingter Effekte auf die Immunzellinvasion wurden die Konzentrationen einzelner Zytokine im Serum der Versuchstiere bestimmt. In allen Apc<sup>min</sup>-Tieren lagen die Konzentrationen für Il6 und auch Tnf $\alpha$  signifikant über den Werten der Kontrolltiere. Diese Tendenz war vor allem bei den heterozygoten Tieren stärker ausgeprägt und bei adäquater Selenversorgung für Il6 signifikant. Zahlreiche Studien zeigen, dass erhöhte Il6 Spiegel mit einer schlechteren Prognose und erhöhten Tumorlast bei Prostata- (Nakashima et al., 2000, Wise et al., 2000) und auch Darmkrebs einhergehen (Knapfer und Preiss, 2010). Ein signifikanter Beitrag zu den Serumspiegeln durch die lokale Produktion maligner Zellen gilt als wahrscheinlich (Deeble et al., 2001). Vergleichbare Ergebnisse ergeben sich auch bei der parallelen Betrachtung beider Zytokinlevel für das

Nierenzellkarzinom (Yoshida et al., 2002) und bei Prostatakrebs (Michalaki et al., 2004). Unter Bezug auf die Ergebnisse zum Grad der Mastzellinvasion in den einzelnen Versuchsgruppen lässt sich ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Parametern auch in unseren Studien vermuten.

#### 4.4 Additive Expression des humanen Transgens und Tumorigenese

Die Ergebnisse der vorrausgegangenen Versuchsabschnitte belegen eindrucksvoll die protektiven Auswirkungen einer diätetischen Supplementation, über den anerkannten Richtwerten für eine optimale Selenversorgung hinaus. Sie unterstreichen die bereits eingangs erwähnten Ergebnisse zur Korrelation genetischer Varianten einzelner Selenoproteine und den Stellenwert von Selenoprotein P in diesem Zusammenhang. Zusammenfassend vermag eine erhöhte Selengabe sogar einen für die SepP-Expression nachteiligen Genotyp zu kompensieren, wenn eine entsprechende Suppletionsstrategie vor der Tumorentstehung verfolgt wird.

Um die Auswirkungen einer gesteigerten SepP-Versorgung über den Blutkreislauf genauer zu beleuchten, wurde bei gleichem Versuchsdesign eine Mauslinie mit zusätzlicher leberspezifischer Expression eines humanen SePP Transgens ( $tg^{hSEPP}$ ) eingekreuzt. Da das Einkreuzen dieser Linie den zum Teil drastischen Phänotyp der SepP<sup>-/-</sup>-Maus abmildert und auch in der Lage ist die Fertilität männlicher Tiere wiederherzustellen, wurde zu Beginn des Versuches von einem grundsätzlich protektiven bzw. therapeutischen Effekt dieses Transgens auf die intestinale Tumorigenese innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen ausgegangen.

Bei adäquater Selenversorgung ergaben sich jedoch nur marginale Unterschiede zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen. Auch ein Effekt des murinen *SepP*-Genotyps auf die Tumoranzahl oder Gesamtfläche konnte bei erster Betrachtung nicht festgestellt werden und bestätigte somit nicht die positive Erwartungshaltung. Weitaus überraschender war jedoch die Ausprägung der einzelnen Größenparameter innerhalb der mit 0,6 ppm Selen supplementierten Versuchsgruppen. Diese supplementierten transgenen Tiere wiesen im Gegensatz zu den nicht-transgenen Tieren signifikant höhere Tumoranzahlen über alle Größenkategorien und eine entsprechend größere Gesamtfläche auf. Analog zur adäquaten Selenversorgung konnte auch in diesen Gruppen ein Einfluss des murinen *SepP*-Genotyps nur bedingt festgestellt werden. Setzt man die Tumoranzahl dieser Gruppen jedoch in Relation zum Selengehalt im Serum, ergibt sich unabhängig von der Fütterungsstrategie ein vergleichbares Muster zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen. Dies impliziert, dass die

heterozygoten Tiere bei Normalisierung auf den plasmatischen Selenstatus zur vermehrten Ausbildung von Adenomen neigen.

Ein protektiver Effekt, wie er im ersten Versuchsteil für die Supplementationsstrategie beschrieben wurde, konnte bei zusätzlicher Expression des humanen Transgens jedoch nicht erzeugt werden. Das Transgen führte in den heterozygoten Versuchstieren sogar zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Ausweitung der allgemeinen Tumorlast. Der Quotient aus Tumoranzahl zum plasmatischen Selengehalt verdeutlicht die „Entkopplung“ des protektiven Effektes bei gesteigerter Selenaufnahme eindrucksvoll und zeigt, dass diese Versuchsgruppen in Bezug auf die Serum-Selenkonzentrationen über eine vergleichsweise höhere Tumorlast verfügen.

Aufgrund der nahezu identischen Serum-Selenkonzentrationen zu den nicht-transgenen  $Apc^{min}$ -Tieren zum Analysezeitpunkt können diese Effekte nicht eindeutig auf die Selen-Verfügbarkeit aus dem plasmatischen Pool erklärt werden. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigen die nur geringen Effekte des Transgens auf den Serum-Selengehalt und lieferten signifikante Unterschiede durch die hSEPP-Expression nur bei  $SepP^{-/-}$ -Tieren. Diese waren dennoch ausreichend, um über eine geförderte Gpx4-Expression in den Testes die beschriebene Infertilität männlicher Tiere aufzuheben (Renko et al., 2008). Als weiterer Marker des Selenstatus zeigt sich auch die plasmatische Gpx3-Aktivität nur geringfügig von den Versuchsbedingungen beeinflusst. Zwar führt eine erhöhte Selenzufuhr über die Nahrung in den wildtypischen hSEPP/ $Apc^{min}$ -Tieren zu einer Steigerung der Enzymaktivität, ein Einfluss der Expression des humanen Transgens im Vergleich zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Die Untersuchung der lokalen Genexpression im Tumor- sowie umliegenden Normalgewebe lieferte keine Anzeichen für eine differentielle Regulation von Selenoproteinen auf Transkriptebeine, bedingt durch die additive hepatische hSEPP-Expression. Innerhalb der transgenen Versuchsgruppen war analog zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen einzig *Dio3* bei adäquater Selenversorgung hochreguliert. Marker-Gene des Wnt-Signalweges, der Angiogenese und Inflammation unterlagen derselben Regulation wie in den nicht-transgenen Tieren.

Die Transkriptmengen für *LRP8* zeigten sich zwar nicht versuchsbedingt, aber dennoch analog zu den nicht-transgenen Versuchsgruppen, im Tumorgewebe signifikant hochreguliert. Unabhängig von der Expression des Transporters zeichnet sich aber dennoch in den transgenen Versuchsgruppen der Trend zu einer verstärkten Selenakkumulation bei gesteigerter nutritiver Versorgung ab. Geht man wiederum von einer wachstumsfördernden

Wirkung von Selen in den späteren Stadien der Tumorentwicklung aus, könnte dies die fortgeschrittene Progression in diesen Gruppen erklären, nicht aber die gesteigerte Tumorquantität.

Für ein fulminanteres Wachstum in diesen Versuchsgruppen sprechen die Ergebnisse zur Mastzellinvasion. Die Mastzellanzahl im Verhältnis zur Tumorfläche war hierbei unabhängig von den Versuchsbedingungen und lag in der Größenordnung der nicht-transgenen Vergleichsgruppen. Bei Auftragung der Mastzellanzahl gegen den Serum-Selengehalt ergab sich jedoch keine direkte Abhängigkeit beider Parameter, wie sie noch im ersten Versuchsteil gezeigt werden konnte.

Die Betrachtung der Zytokinspiegel im Serum resultierte in weiteren Unterschieden zwischen transgenen und nicht-transgenen Versuchstieren. Während sich in den nicht-transgenen Gruppen noch die Tendenz zu vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen für Il6 und Tnfa bei wildtypischen  $Apc^{min}$ -Tieren abzeichnete, konnte dies für die transgenen Tiere nicht bestätigt werden. Dies bekräftigt eine mögliche Korrelation zum Grad der Mastzellinvasion und der in verschiedenen Studien beschriebenen schlechteren Prognose von Krebspatienten mit erhöhten Serumspiegeln für beide Zytokine (Michalaki et al., 2004, Yoshida et al., 2002).

Neben Il6 und Tnfa lagen erhöhte Werte für die Serumspiegel von Il10 in allen transgenen Versuchsgruppen vor. Die Rolle von Il10 in der Tumorentwicklung wird derzeit kontrovers diskutiert und ist sehr komplex. Eine verstärkte Il10 Expression durch Tumorzellen zeigt sich unter anderem für das Plattenepithelkarzinom (Kim et al., 1995), das Nierenzellkarzinom (Knoefel et al., 1997), Brustkrebs (Green et al., 1997) und auch Darmkrebs (Ordemann et al., 2002). Erhöhte Serumkonzentrationen wurden bei Krebspatienten mit malignen Melanomen (Dummer et al., 1995) oder dem Non-Hodgkin-Lymphom (Guney et al., 2009) gemessen. Durch die Inhibition von Apoptose und die Förderung der Proliferation von Tumorzellen kann Il10 die Tumorentwicklung begünstigen (Sato et al., 2011).

Ob nun eine verbesserte Versorgung des Tumors mit Selen durch zirkulierendes hSEPP die Tumorigenese fördert oder evtl. seine Funktion als Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase modulatorische Effekte in der Immunantwort vermittelt, kann nur in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Wenn man die geringen Auswirkungen der Transgen-Expression auf den Selengehalt bedenkt, sollte in diesem Zusammenhang überprüft werden, in welchem Ausmaß hSEPP zum Selentransport beiträgt oder ob es zur Expression einer Protein-Isoform mit verringertem Transportvermögen kommt. Eine vermehrte Bildung Cys-haltiger Varianten der Txnrd 1&3 konnte bei Se-Restriktion bereits nachgewiesen werden (Xu et al., 2010).



Die Ergebnisse dieses Versuchsabschnittes weisen zusammenfassend darauf hin, dass der Einfluss der zusätzlichen Expression von hSEPP nicht zwingend als wachstumsfördernd, aber dennoch als anti-protektiv einzustufen ist. Interessanterweise zeigt sich aber auch hierbei eine Interaktion von Genotyp und nutritiver Versorgung, und unterstreicht, dass bei der Diskussion von Selen und Selenoproteinen in Bezug auf Darmtumorigenese von einer allzu einfachen Verallgemeinerung abgesehen werden sollte.

#### 4.5 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine eindeutige Abhängigkeit der kolorektalen Tumorigenese einerseits vom Grad der nutritiven Selenversorgung und andererseits von der Genexpression des Selentransporters SepP. Die negativen Auswirkungen eines nachteiligen SepP-Genotyps (SepP<sup>+/-</sup>) konnten über eine vorbeugende Selensupplementation nicht nur kompensiert werden, sondern es zeigte sich ein zusätzliches protektives Potential. Eine zusätzliche hepatische hSEPP-Expression konnte keine wachstumshemmenden Effekte auf die Tumorentwicklung vermitteln und führte zur Aufhebung der Selen-vermittelten protektiven Effekte in den entsprechenden Supplementationsversuchen.

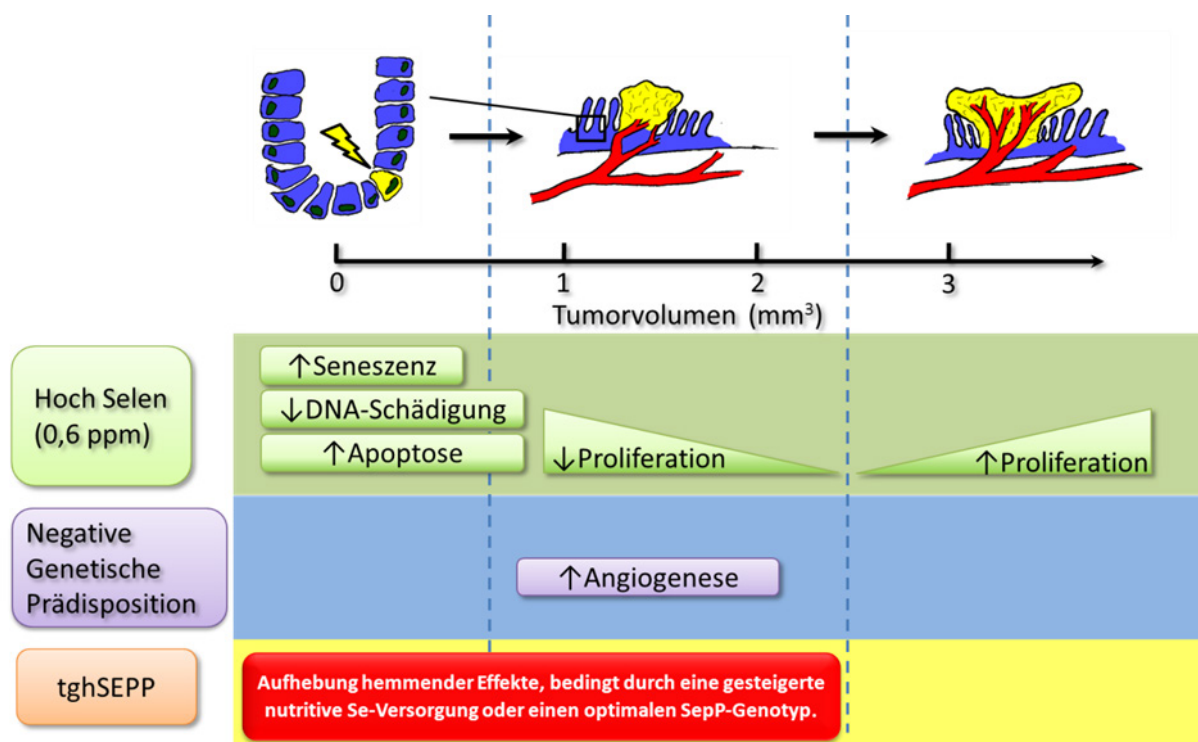
Eine verringerte SepP-Genexpression führte zur Ausbildung größerer Tumore ohne aber die Gesamtumorlast signifikant zu beeinflussen. Die Tumorprogression scheint somit stark abhängig von einer intakten Transport- und Speicherfunktion, wie sie über SepP gewährleistet wird. Die drastische Reduktion der Selen-Serumkonzentration in heterozygoten Tieren unterstreicht diese Theorie. Eine gesteigerte Progression spiegelte sich auch im schlechteren Differenzierungsgrad der Tumore heterozygoter Tiere wider. Als möglicher Mechanismus hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Effekt des Selenstatus auf die Immunantwort identifiziert werden, die sich über eine erhöhte Infiltration von Mastzellen ins Tumorgewebe und Unterschiede in der Freisetzung zirkulierender Zytokine manifestiert. Die identifizierten proinflammatorischen Zytokine sind als Angiogenese-Stimulatoren bekannt, während Mastzellproteasen über den Abbau extrazellulärer Matrix die Tumorprogression begünstigen können. Ein Zusammenspiel dieser beiden tumorfördernden Effekte könnte den abweichenden Verteilungsmustern der Tumorspektren zu Grunde liegen.

Weiterhin zeigte sich die Tumorigenese vom Grad der nutritiven Selenversorgung abhängig. Unabhängig von der genetischen Prädisposition konnte ein protektiver Effekt des Selenstatus auf die Tumoranzahl sowie die gesamte Tumorfläche festgestellt werden. Zusätzlich konnten die negativen Einflüsse einer verminderten SepP-Expression über eine gesteigerte diätetische Selenverfügbarkeit kompensiert werden. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass Selen unter diesen Bedingungen sowohl chemopräventiv bei der Tumorentstehung als auch wachstumshemmend wirkt. Die untersuchten Biomarker zur Bestimmung des allgemeinen Selenstatus (Gpx3-Aktivität, Serum-Selenspiegel) zeigten sich vom Grad der nutritiven Selenaufnahme im Versuch weitgehend unbeeinflusst; über diese Selenbiomarker kann allerdings die Expression intrazellulärer Selenoproteine nicht abgebildet werden. Im Tumorgewebe konnte das Gen des Selenoenzyms Deiodase 3 (Dio3) als selenabhängig identifiziert werden. Eine Induktion der Schilddrüsenhormon-

inaktivierenden Dio3 im Tumor wirkt über den Abbau des Differenzierungsstimulus T3 generell de-differenzierend, so dass dieses Ergebnis mit der beobachteten Tumorprogression unter RDA Bedingungen korreliert und auch im Zusammenhang weiterer Neoplasien als Erklärungsansatz diskutiert wird. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse können modulierende Effekte des Selens bzw. der SepP-Expression auf verschiedene Stadien der Tumorigenese abgeleitet werden.

Im Kontext einer verringerten SepP-Expression zeigte sich hier insbesondere die Mastzellinvasion im Tumorgewebe verändert. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, inwieweit diese Besiedlung über pro-angiogenetische Mechanismen entscheidend zum veränderten Tumorwachstum beiträgt. Um auch die Auswirkungen einer gesteigerten Selenversorgung auf Seneszenz, DNA-Schädigung, Apoptose oder die Akkumulation von Selen im Tumor tierexperimentell zu untersuchen, sollte eine differenzierte Analyse durchgeführt werden, die dem Grad der Tumorentwicklung Rechnung trägt. In Abbildung 49 sind potentiell regulierte Mechanismen zur Kontrolle der Tumorigenese unter Berücksichtigung der Tumorentwicklung dargestellt.



**Abbildung 49: Potentielle Ansatzpunkte der Selenwirkung in der APC-abhängigen intestinalen Tumorigenese.** Eine gesteigerte Selenversorgung kann möglicherweise über den Schutz vor DNA-Schädigung sowie die Förderung von Seneszenz und Apoptose negativ auf die Tumorinitiation wirken. Die Akkumulation von Selen im Tumor vermittelt mit fortschreitender Progression zunehmend proliferationsfördernde Effekte. Bei verringerter SepP-Genexpression könnte die gesteigerte Mastzellinvasion die für das Tumorwachstum essentielle Angiogenese unterstützen. Eine Intervention durch die additive Expression von hSEPP führte zur Aufhebung der beschriebenen chemopräventiven und wachstumshemmenden Effekte.

Eine Selen-Supplementation im Rahmen der Krebsprävention ist somit als durchaus vielversprechend anzusehen. Gerade für Europäer, die generell als unterversorgt gelten, bietet sie eine Möglichkeit, das individuelle Krebsrisiko zu senken. Dennoch zeigen die vorliegenden Ergebnisse (Hoch-Selen Therapie, additive Expression von hSEPP), dass eine Intervention durch aktive Selensupplementation nach erfolgter Tumoranlage kritisch zu betrachten ist und von einem Einsatz von Selen als adjuvantes Therapeutikum bei APC-abhängiger intestinaler Tumorigenese abgeraten werden muss. Nichtsdestotrotz belegen aber die genetischen und diätetischen Interventionen in dieser Arbeit eindeutig die Bedeutung einer ausreichenden Selenversorgung und einer ungestörten SepP-Expression für die Tumorprävention im Gastrointestinaltrakt. Ein Selenmangel oder eine verringerte SepP-Genexpression muss eindeutig als Darmkrebsrisikofaktor betrachtet und entsprechend korrigiert werden.

## Literaturverzeichnis

- Aaltomaa, S.; Lipponen, P.; Papinaho, S. und Kosma, V. M. (1993): Mast cells in breast cancer, *Anticancer Res* 13 [3], Seite 785-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8317912>
- Akesson, B.; Bellew, T. und Burk, R. F. (1994): Purification of Selenoprotein-P from Human Plasma, *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1204 [2], Seite 243-249. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8142465>
- Akesson, B.; Bellew, T. und Burk, R. F. (1994): Purification of selenoprotein P from human plasma, *Biochim Biophys Acta* 1204 [2], Seite 243-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8142465>
- Akesson, B. und Martensson, B. (1991): Chromatography of selenoproteins in human serum using matrix-bound heparin, *Int J Vitam Nutr Res* 61 [1], Seite 72-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1856049>
- Al-Taie, O. H.; Seufert, J.; Mork, H.; Treis, H.; Mentrup, B.; Thalheimer, A.; Starostik, P.; Abel, J.; Scheurlen, M.; Kohrle, J. und Jakob, F. (2002): A complex DNA-repeat structure within the Selenoprotein P promoter contains a functionally relevant polymorphism and is genetically unstable under conditions of mismatch repair deficiency, *Eur J Hum Genet* 10 [9], Seite 499-504. URL: <http://www.nature.com/ejhg/journal/v10/n9/pdf/5200811a.pdf>
- Al-Taie, O. H.; Uceyler, N.; Eubner, U.; Jakob, F.; Mork, H.; Scheurlen, M.; Brigelius-Flohe, R.; Schottker, K.; Abel, J.; Thalheimer, A.; Katzenberger, T.; Illert, B.; Melcher, R. und Kohrle, J. (2004): Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 48 [1], Seite 6-14. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15203372>
- Alberts, D. S.; Martinez, M. E.; Roe, D. J.; Guillen-Rodriguez, J. M.; Marshall, J. R.; van Leeuwen, J. B.; Reid, M. E.; Ritenbaugh, C.; Vargas, P. A.; Bhattacharyya, A. B.; Earnest, D. L. und Sampliner, R. E. (2000): Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. Phoenix Colon Cancer Prevention Physicians' Network, *N Engl J Med* 342 [16], Seite 1156-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770980>
- Andrews, E. D.; Hartley, W. J. und Grant, A. B. (1968): Selenium-responsive diseases of animals in New Zealand, *N Z Vet J* 16 [1-2], Seite 3-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5239798>
- Arner, E. S. und Holmgren, A. (2000): Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur J Biochem* 267 [20], Seite 6102-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012661>
- Arthur, J. R.; Nicol, F. und Beckett, G. J. (1990): Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium, *Biochem J* 272 [2], Seite 537-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268281>
- Baines, A.; Taylor-Parker, M.; Goulet, A. C.; Renaud, C.; Gerner, E. W. und Nelson, M. A. (2002): Selenomethionine inhibits growth and suppresses cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in human colon cancer cell lines, *Cancer Biol Ther* 1 [4], Seite 370-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432249>
- Baker, S. S. und Cohen, H. J. (1984): Increased sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in glutathione peroxidase-deficient rat granulocytes, *J Nutr* 114 [11], Seite 2003-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6491756>
- Banerjee, C. K. und Sani, B. P. (1982): Selenium Binding-Proteins in Rat-Tissues, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 109 [1], Seite 210-216. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7159422>
- Bansal, M. P.; Mukhopadhyay, T.; Scott, J.; Cook, R. G.; Mukhopadhyay, R. und Medina, D. (1990): DNA Sequencing of a Mouse-Liver Protein That Binds Selenium - Implications for Seleniums Mechanism of Action in Cancer Prevention, *Carcinogenesis* 11 [11], Seite 2071-2073. URL: <http://carcin.oxfordjournals.org/content/11/11/2071.full.pdf>
- Bansal, M. P.; Oborn, C. J.; Danielson, K. G. und Medina, D. (1989): Evidence for two selenium-binding proteins distinct from glutathione peroxidase in mouse liver, *Carcinogenesis* 10 [3], Seite 541-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2924398>

- Barker, N. und Clevers, H. (2006): Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics, *Nat Rev Drug Discov* 5 [12], Seite 997-1014. URL: <http://www.nature.com/nrd/journal/v5/n12/pdf/nrd2154.pdf>
- Beath, O. A.; Draize, J. H.; Eppson, H. F.; Gilbert, C. S. und McCreary, O. C. (1934): Certain poisonous plants of wyoming activated by selenium and their association with respect to soil types, *Journal of the American Pharmaceutical Association* 23 [2], Seite 94-97. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.3080230204>
- Behne, D. und Kyriakopoulos, A. (2001): Mammalian selenium-containing proteins, *Annu Rev Nutr* 21, Seite 453-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375445>
- Behne, D.; Kyriakopoulos, A.; Meinhold, H. und Kohrle, J. (1990): Identification of Type-I Iodothyronine 5'-Deiodinase as a Selenoenzyme, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173 [3], Seite 1143-1149. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268318>
- Berry, M. J. (2005): Insights into the hierarchy of selenium incorporation, *Nature Genetics* 37 [11], Seite 1162-1163. URL: <http://www.nature.com/ng/journal/v37/n11/pdf/ng1105-1162.pdf>
- Berry, M. J. (2005): Knowing when not to stop, *Nature Structural & Molecular Biology* 12 [5], Seite 389-390. URL: <http://www.nature.com/nsmb/journal/v12/n5/pdf/nsmb0505-389.pdf>
- Berry, M. J.; Banu, L.; Chen, Y.; Mandel, S. J.; Kieffer, J. D.; Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1991): Recognition of Uga as a Selenocysteine Codon in Type-I Deiodinase Requires Sequences in the 3' Untranslated Region, *Nature* 353 [6341], Seite 273-276. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v353/n6341/pdf/353273a0.pdf>
- Berry, M. J.; Banu, L.; Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1993): Functional-Characterization of the Eukaryotic Secis Elements Which Direct Selenocysteine Insertion at Uga Codons, *Embo Journal* 12 [8], Seite 3315-3322. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413599/?tool=pubmed>
- Berry, M. J.; Banu, L. und Larsen, P. R. (1991): Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme, *Nature* 349 [6308], Seite 438-40. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v349/n6308/pdf/349438a0.pdf>
- Berry, M. J.; Kieffer, J. D.; Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1991): Selenocysteine Confers the Biochemical-Properties Characteristic of the Type-I Iodothyronine Deiodinase, *Journal of Biological Chemistry* 266 [22], Seite 14155-14158. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1830583>
- Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T. B.; Oukka, M.; Weiner, H. L. und Kuchroo, V. K. (2006): Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature* 441 [7090], Seite 235-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648838>
- Binas, B. und Erol, E. (2007): FABPs as determinants of myocellular and hepatic fuel metabolism, *Mol Cell Biochem* 299 [1-2], Seite 75-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001451>
- Bjelakovic, G.; Nagorni, A.; Nikolova, D.; Simonetti, R. G.; Bjelakovic, M. und Gluud, C. (2006): Meta-analysis: antioxidant supplements for primary and secondary prevention of colorectal adenoma, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 24 [2], Seite 281-291. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842454>
- Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Simonetti, R. G. und Gluud, C. (2004): Antioxidant supplements for preventing gastrointestinal cancers, *Cochrane Database Syst Rev* [4], Seite CD004183. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15495084>
- Blot, W. J.; Li, J. Y.; Taylor, P. R.; Guo, W.; Dawsey, S.; Wang, G. Q.; Yang, C. S.; Zheng, S. F.; Gail, M.; Li, G. Y. und et al. (1993): Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population, *J Natl Cancer Inst* 85 [18], Seite 1483-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360931>
- Bock, A.; Forchhammer, K.; Heider, J.; Leinfelder, W.; Sawers, G.; Veprek, B. und Zinoni, F. (1991): Selenocysteine - the 21st Amino-Acid, *Molecular Microbiology* 5 [3], Seite 515-520. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1828528>
- Boolbol, S. K.; Dannenberg, A. J.; Chadburn, A.; Martucci, C.; Guo, X. J.; Ramonetti, J. T.; Abreu-Goris, M.; Newmark, H. L.; Lipkin, M. L.; DeCosse, J. J. und Bertagnolli, M. M. (1996): Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial

- adenomatous polyposis, Cancer Res 56 [11], Seite 2556-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8653697>
- Bosl, M. R.; Takaku, K.; Oshima, M.; Nishimura, S. und Taketo, M. M. (1997): Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94 [11], Seite 5531-5534. URL: <http://www.pnas.org/content/94/11/5531.full.pdf>
- Bowrey, P. F.; King, J.; Magarey, C.; Schwartz, P.; Marr, P.; Bolton, E. und Morris, D. L. (2000): Histamine, mast cells and tumour cell proliferation in breast cancer: does preoperative cimetidine administration have an effect?, Br J Cancer 82 [1], Seite 167-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638985>
- Brinkman, M.; Reulen, R. C.; Kellen, E.; Buntinx, F. und Zeegers, M. P. (2006): Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?, European Journal of Cancer 42 [15], Seite 2463-2471. URL: <Go to ISI>://000241926300016
- Brown, L. M.; Helmke, S. M.; Hunsucker, S. W.; Netea-Maier, R. T.; Chiang, S. A.; Heinz, D. E.; Shroyer, K. R.; Duncan, M. W. und Haugen, B. R. (2006): Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue, Mol Carcinog 45 [8], Seite 613-26. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788983>
- Burk, R. F. und Hill, K. E. (1993): Regulation of Selenoproteins, Annual Review of Nutrition 13, Seite 65-81. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8369160>
- Burk, R. F. und Hill, K. E. (2005): Selenoprotein P: An extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis, Annual Review of Nutrition 25, Seite 215-235. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16011466>
- Burk, R. F. und Hill, K. E. (2009): Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals, Biochim Biophys Acta 1790 [11], Seite 1441-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345254>
- Burk, R. F.; Hill, K. E.; Boeglin, M. E.; Ebner, F. F. und Chittum, H. S. (1997): Selenoprotein P associates with endothelial cells in rat tissues, Histochem Cell Biol 108 [1], Seite 11-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377220>
- Burk, R. F.; Hill, K. E. und Motley, A. K. (2003): Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P, J Nutr 133 [5 Suppl 1], Seite 1517S-20S. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730456>
- Burk, R. F.; Hill, K. E.; Motley, A. K.; Austin, L. M. und Norsworthy, B. K. (2006): Deletion of selenoprotein P upregulates urinary selenium excretion and depresses whole-body selenium content, Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects 1760 [12], Seite 1789-1793. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17014962>
- Burk, R. F.; Hill, K. E.; Olson, G. E.; Weeber, E. J.; Motley, A. K.; Winfrey, V. P. und Austin, L. M. (2007): Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed, J Neurosci 27 [23], Seite 6207-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553992>
- Cao, Y. (2009): Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy, Front Biosci 14, Seite 3962-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273326>
- Carlson, B. A.; Novoselov, S. V.; Kumaraswamy, E.; Lee, B. J.; Anver, M. R.; Gladyshev, V. N. und Hatfield, D. L. (2004): Specific excision of the selenocysteine tRNA[Ser]Sec (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function, J Biol Chem 279 [9], Seite 8011-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14660662>
- Carothers, A. M.; Moran, A. E.; Cho, N. L.; Redston, M. und Bertagnoli, M. M. (2006): Changes in antitumor response in C57BL/6J-Min/+ mice during long-term administration of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, Cancer Res 66 [12], Seite 6432-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778222>
- Castellano, S.; Lobanov, A. V.; Chapple, C.; Novoselov, S. V.; Albrecht, M.; Hua, D.; Lescure, A.; Lengauer, T.; Krol, A.; Gladyshev, V. N. und Guigo, R. (2005): Diversity and functional plasticity of eukaryotic selenoproteins: identification and characterization of the SelJ family, Proc Natl Acad Sci U S A 102 [45], Seite 16188-93. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260744>

- Charalabopoulos, K.; Kotsalos, A.; Batistatou, A.; Charalabopoulos, A.; Peschos, D.; Vezyraki, P.; Kalfakakou, V.; Metsios, A.; Charalampopoulos, A.; Macheras, A.; Agnantis, N. und Evangelou, A. (2009): Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA, *Anticancer Res* 29 [8], Seite 3465-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19661375>
- Charalabopoulos, K.; Kotsalos, A.; Batistatou, A.; Charalabopoulos, A.; Vezyraki, P.; Peschos, D.; Kalfakakou, V. und Evangelou, A. (2006): Selenium in serum and neoplastic tissue in breast cancer: correlation with CEA, *Br J Cancer* 95 [6], Seite 674-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880784>
- Chavatte, L.; Brown, B. A. und Driscoll, D. M. (2005): Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes, *Nature Structural & Molecular Biology* 12 [5], Seite 408-416. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821744>
- Chen, J. W.; Cao, Q.; Qin, C.; Shao, P. F.; Wu, Y. L.; Wang, M. L.; Zhang, Z. D. und Yin, C. J. (2011): GPx-1 polymorphism (rs1050450) contributes to tumor susceptibility: evidence from meta-analysis, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 137 [10], Seite 1553-1561. URL: <http://www.springerlink.com/content/j9t333t330w20886/fulltext.pdf>
- Chiu-Ugalde, J.; Theilig, F.; Behrends, T.; Drebes, J.; Sieland, C.; Subbarayal, P.; Kohrle, J.; Hammes, A.; Schomburg, L. und Schweizer, U. (2010): Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain, *Biochem J* 431 [1], Seite 103-11. URL: <http://www.biochemj.org/bj/431/0103/4310103.pdf>
- Chiu, C. H.; McEntee, M. F. und Whelan, J. (1997): Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis, *Cancer Res* 57 [19], Seite 4267-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331087>
- Cho, Y. M.; Bae, S. H.; Choi, B. K.; Cho, S. Y.; Song, C. W.; Yoo, J. K. und Paik, Y. K. (2003): Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice, *Proteomics* 3 [10], Seite 1883-94. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625850>
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry* 162 [1], Seite 156-159. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>
- Christensen, M. J.; Nartey, E. T.; Hada, A. L.; Legg, R. L. und Barzee, B. R. (2007): High selenium reduces NF-kappaB-regulated gene expression in uninduced human prostate cancer cells, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 58 [2], Seite 197-204. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640166>
- Clark, L. C.; Combs, G. F., Jr.; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. K.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, G. F.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Leshner, J. L., Jr.; Park, H. K.; Sanders, B. B., Jr.; Smith, C. L. und Taylor, J. R. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group, *Jama* 276 [24], Seite 1957-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8971064](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8971064)
- Clark, L. C.; Graham, G. F.; Crounse, R. G.; Grimson, R.; Hulka, B. und Shy, C. M. (1984): Plasma selenium and skin neoplasms: a case-control study, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 6 [1], Seite 13-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6545569>
- Clevers, H. (2004): At the crossroads of inflammation and cancer, *Cell* 118 [6], Seite 671-674. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369667>
- Cohen, H. J.; Chovaniec, M. E.; Mistretta, D. und Baker, S. S. (1985): Selenium repletion and glutathione peroxidase--differential effects on plasma and red blood cell enzyme activity, *Am J Clin Nutr* 41 [4], Seite 735-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920895>
- Combs, G. F.; Jackson, M. I.; Watts, J. C.; Johnson, L. K.; Zeng, H.; Idso, J.; Schomburg, L.; Hoeg, A.; Hoefig, C. S.; Chiang, E. C.; Waters, D. J.; Davis, C. D. und Milner, J. A. (2011): Differential responses to selenomethionine supplementation by sex and genotype in healthy adults, *Br J Nutr*, Seite 1-12. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21936966>



- Combs, G. F., Jr. (1999): Chemopreventive mechanisms of selenium, *Med Klin (Munich)* 94 Suppl 3, Seite 18-24. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10554523>
- Combs, G. F., Jr. (2001): Selenium in global food systems, *Br J Nutr* 85 [5], Seite 517-47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348568>
- Combs, G. F., Jr. und Gray, W. P. (1998): Chemopreventive agents: selenium, *Pharmacol Ther* 79 [3], Seite 179-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776375>
- Coussens, L. M.; Raymond, W. W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Caughey, G. H. und Hanahan, D. (1999): Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis, *Genes Dev* 13 [11], Seite 1382-97. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364156>
- Coussens, L. M. und Werb, Z. (2002): Inflammation and cancer, *Nature* 420 [6917], Seite 860-7. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6917/pdf/nature01322.pdf>
- Dabiri, S.; Huntsman, D.; Makretsov, N.; Cheang, M.; Gilks, B.; Bajdik, C.; Gelmon, K.; Chia, S. und Hayes, M. (2004): The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis, *Mod Pathol* 17 [6], Seite 690-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044916>
- Dameron, K. M.; Volpert, O. V.; Tainsky, M. A. und Bouck, N. (1994): Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science* 265 [5178], Seite 1582-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521539>
- Davis, C. D.; Zeng, H. und Finley, J. W. (2002): Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice, *J Nutr* 132 [2], Seite 307-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823596>
- Deeble, P. D.; Murphy, D. J.; Parsons, S. J. und Cox, M. E. (2001): Interleukin-6-and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells, *Molecular and Cellular Biology* 21 [24], Seite 8471-8482. URL: <Go to ISI>://000172315800021
- Dentice, M.; Ambrosio, R. und Salvatore, D. (2009): Role of type 3 deiodinase in cancer, *Expert Opin Ther Targets* 13 [11], Seite 1363-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19764892>
- Diplock, A. T. (1987): Trace elements in human health with special reference to selenium, *Am J Clin Nutr* 45 [5 Suppl], Seite 1313-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3578121>
- Djokovic, D.; Trindade, A.; Gigante, J.; Badenes, M.; Silva, L.; Liu, R.; Li, X.; Gong, M.; Krasnoperov, V.; Gill, P. S. und Duarte, A. (2010): Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis, *BMC Cancer* 10, Seite 641. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092311>
- Dreher, I.; Jakobs, T. C. und Kohrle, J. (1997): Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter - Response of selenoprotein P expression to cytokines in liver cells, *Journal of Biological Chemistry* 272 [46], Seite 29364-29371. URL: <http://www.jbc.org/content/272/46/29364.full.pdf>
- Duffield-Lillico, A. J.; Reid, M. E.; Turnbull, B. W.; Combs, G. F., Jr.; Slate, E. H.; Fischbach, L. A.; Marshall, J. R. und Clark, L. C. (2002): Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 [7], Seite 630-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101110>
- Dumitrescu, A. M.; Liao, X. H.; Abdullah, M. S.; Lado-Abeal, J.; Majed, F. A.; Moeller, L. C.; Boran, G.; Schomburg, L.; Weiss, R. E. und Refetoff, S. (2005): Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism, *Nat Genet* 37 [11], Seite 1247-52. URL: <http://www.nature.com/ng/journal/v37/n11/pdf/ng1654.pdf>
- Dummer, W.; Becker, J. C.; Schwaaf, A.; Leverkus, M.; Moll, T. und Bocker, E. B. (1995): Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma, *Melanoma Res* 5 [1], Seite 67-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7734958>

- Emerit, I. (1994): Reactive Oxygen Species, Chromosome Mutation, and Cancer - Possible Role of Clastogenic Factors in Carcinogenesis, *Free Radical Biology and Medicine* 16 [1], Seite 99-109. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300000>
- Endermann, T. (eingereicht 2012): Die Selen-abhängige Tumorigenese im Mausmodell: Einfluss des Selenoprotein P-Genotyps und des COX2-Hemmers Sulindac, Dissertation, Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin.
- Erdman, S. E.; Sohn, J. J.; Rao, V. P.; Nambiar, P. R.; Ge, Z.; Fox, J. G. und Schauer, D. B. (2005): CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in ApcMin/+ mice, *Cancer Res* 65 [10], Seite 3998-4004. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899788>  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/10/3998.full.pdf>
- Fisher, E. R.; Paik, S. M.; Rockette, H.; Jones, J.; Caplan, R. und Fisher, B. (1989): Prognostic significance of eosinophils and mast cells in rectal cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (protocol R-01), *Hum Pathol* 20 [2], Seite 159-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2562788>
- Flohe, L. und Gunzler, W. A. (1984): Assays of Glutathione-Peroxidase, *Methods in Enzymology* 105, Seite 114-121. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659>
- Flohe, L.; Gunzler, W. A. und Schock, H. H. (1973): Glutathione peroxidase: a selenoenzyme, *FEBS Lett* 32 [1], Seite 132-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4736708>
- Franke, K.W. (1934): A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuffs. 1. Results obtained in preliminary feeding trials, *The Journal of Nutrition* [8], Seite 597-608.
- Frieling, T.; Meis, K.; Kolck, U. W.; Homann, J.; Hulsdonk, A.; Haars, U.; Hertfelder, H. J.; Oldenburg, J.; Seidel, H. und Molderings, G. J. (2011): Evidence for mast cell activation in patients with therapy-resistant irritable bowel syndrome, *Z Gastroenterol* 49 [2], Seite 191-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21298604>
- Frost, D. V. (1972): The two faces of selenium--can selenophobia be cured?, *CRC Crit Rev Toxicol* 1 [4], Seite 467-514. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4564866>
- Fulton, A. M.; Loveless, S. E. und Heppner, G. H. (1984): Mutagenic activity of tumor-associated macrophages in *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA 100, *Cancer Res* 44 [10], Seite 4308-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6380706>
- Gao, A. C.; Dong, Y.; Lee, S. O.; Zhang, H. T.; Marshall, J. und Ip, C. (2004): Prostate specific antigen expression is down-regulated by selenium through disruption of androgen receptor signaling, *Cancer Research* 64 [1], Seite 19-22. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/1/19.full.pdf>
- Gilbert (1818): Chemische Entdeckungen im Mineralreiche, gemacht zu Fahlun in Schweden: Selenium ein neuer metallartiger Körper, Lithon ein neues Alkali, Thorina eine neue Erde, *Annalen der Physik* 59 [7], Seite 229-254.
- Giometti, C. S.; Liang, X. L.; Tollaksen, S. L.; Wall, D. B.; Lubman, D. M.; Subbarao, V. und Rao, M. S. (2000): Mouse liver selenium-binding protein decreased in abundance by peroxisome proliferators, *Electrophoresis* 21 [11], Seite 2162-2169. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10892727>
- Gladyshev, V. N.; Kryukov, G. V.; Fomenko, D. E. und Hatfield, D. L. (2004): Identification of trace element-containing proteins in genomic databases, *Annu Rev Nutr* 24, Seite 579-96. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189132>
- Glatt, S. J.; Everall, I. P.; Kremen, W. S.; Corbeil, J.; Sasik, R.; Khanlou, N.; Han, M.; Liew, C. C. und Tsuang, M. T. (2005): Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 [43], Seite 15533-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223876>
- Gonzalez-Moreno, O.; Boque, N.; Redrado, M.; Milagro, F.; Campion, J.; Endermann, T.; Takahashi, K.; Saito, Y.; Catena, R.; Schomburg, L. und Calvo, A. (2010): Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage, *Prostate*. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21086459>

- Gonzalez-Moreno, O.; Boque, N.; Redrado, M.; Milagro, F.; Campion, J.; Endermann, T.; Takahashi, K.; Saito, Y.; Catena, R.; Schomburg, L. und Calvo, A. (2011): Selenoprotein-P is down-regulated in prostate cancer, which results in lack of protection against oxidative damage, *Prostate* 71 [8], Seite 824-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21456065>
- Gounaris, E.; Erdman, S. E.; Restaino, C.; Gurish, M. F.; Friend, D. S.; Gounari, F.; Lee, D. M.; Zhang, G.; Glickman, J. N.; Shin, K.; Rao, V. P.; Poutahidis, T.; Weissleder, R.; McNagny, K. M. und Khazaie, K. (2007): Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 [50], Seite 19977-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077429>
- Graham, R. M. und Graham, J. B. (1966): Mast cells and cancer of the cervix, *Surg Gynecol Obstet* 123 [1], Seite 3-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5947123>
- Green, A. R.; Green, V. L.; White, M. C. und Speirs, V. (1997): Expression of cytokine messenger RNA in normal and neoplastic human breast tissue: identification of interleukin-8 as a potential regulatory factor in breast tumours, *International Journal of Cancer* 72 [6], Seite 937-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378554>
- Greenberg, E. R.; Baron, J. A.; Tosteson, T. D.; Freeman, D. H., Jr.; Beck, G. J.; Bond, J. H.; Colacchio, T. A.; Collier, J. A.; Frankl, H. D.; Haile, R. W. und et al. (1994): A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group, *N Engl J Med* 331 [3], Seite 141-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8008027>
- Greten, F. R.; Eckmann, L.; Greten, T. F.; Park, J. M.; Li, Z. W.; Egan, L. J.; Kagnoff, M. F. und Karin, M. (2004): IKK beta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer, *Cell* 118 [3], Seite 285-296. URL: <Go to ISI>://000223353100006
- Griffiths, N. M.; Stewart, R. D. und Robinson, M. F. (1976): The metabolism of [75Se]selenomethionine in four women, *Br J Nutr* 35 [3], Seite 373-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/817734>
- Gromer, S.; Eubel, J. K.; Lee, B. L. und Jacob, J. (2005): Human selenoproteins at a glance, *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 [21], Seite 2414-2437. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16231092>
- Gryfe, R.; Swallow, C.; Bapat, B.; Redston, M.; Gallinger, S. und Couture, J. (1997): Molecular biology of colorectal cancer, *Curr Probl Cancer* 21 [5], Seite 233-300. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9438104>
- Guimaraes, M. J.; Peterson, D.; Vicari, A.; Cocks, B. G.; Copeland, N. G.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Ferrick, D. A.; Kastelein, R. A.; Bazan, J. F. und Zlotnik, A. (1996): Identification of a novel selD homolog from Eukaryotes, Bacteria, and Archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 [26], Seite 15086-15091. URL: <http://www.pnas.org/content/93/26/15086.full.pdf>
- Gulubova, M. und Vlaykova, T. (2009): Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer, *J Gastroenterol Hepatol* 24 [7], Seite 1265-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645466>
- Guney, N.; Soyuncu, H. O.; Basaran, M.; Bavbek, S.; Derin, D.; Camlica, H.; Yasasever, V. und Topuz, E. (2009): Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 in Turkish patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma, *Asian Pac J Cancer Prev* 10 [4], Seite 669-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19827892>
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 [5], Seite 646-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
- Harmey, J. H.; Bucana, C. D.; Lu, W.; Byrne, A. M.; McDonnell, S.; Lynch, C.; Bouchier-Hayes, D. und Dong, Z. (2002): Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion, *International Journal of Cancer* 101 [5], Seite 415-22. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216068>
- Hartveit, F. (1981): Mast cells and metachromasia in human breast cancer: their occurrence, significance and consequence: a preliminary report, *J Pathol* 134 [1], Seite 7-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169818>

- Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (2002): How selenium has altered our understanding of the genetic code, *Molecular and Cellular Biology* 22 [11], Seite 3565-3576. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11997494>
- Herrman, J. L. (1977): The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite, *Biochim Biophys Acta* 500 [1], Seite 61-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21703>
- Hill, K. E.; Zhou, J. D.; Austin, L. M.; Motley, A. K.; Ham, A. J. L.; Olson, G. E.; Atkins, J. F.; Gesteland, R. F. und Burk, R. F. (2007): The selenium-rich C-terminal domain of mouse selenoprotein P is necessary for the supply of selenium to brain and testis but not for the maintenance of whole body selenium, *Journal of Biological Chemistry* 282 [15], Seite 10972-10980. URL: <http://www.jbc.org/content/282/15/10972.full.pdf>
- Hill, K. E.; Zhou, J. D.; McMahan, W. J.; Motley, A. K.; Atkins, J. F.; Gesteland, R. F. und Burk, R. F. (2003): Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse, *Journal of Biological Chemistry* 278 [16], Seite 13640-13646. URL: <http://www.jbc.org/content/278/16/13640.full.pdf#page=1&view=FitH>
- Hill, K. E.; Zhou, J. D.; McMahan, W. J.; Motley, A. K. und Burk, R. F. (2004): Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene, *Journal of Nutrition* 134 [1], Seite 157-161. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704310>
- Hiromatsu, Y. und Toda, S. (2003): Mast cells and angiogenesis, *Microsc Res Tech* 60 [1], Seite 64-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500262>
- Hoeflich, J.; Hollenbach, B.; Behrends, T.; Hoeg, A.; Stosnach, H. und Schomburg, L. (2010): The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians, *Br J Nutr* 104 [11], Seite 1601-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637135>
- Holmgren, A. und Zhong, L. W. (2000): Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations, *Journal of Biological Chemistry* 275 [24], Seite 18121-18128. URL: <http://www.jbc.org/content/275/24/18121.full.pdf>
- Huber, R. E. und Criddle, R. S. (1967): The isolation and properties of beta-galactosidase from *Escherichia coli* grown on sodium selenate, *Biochim Biophys Acta* 141 [3], Seite 587-99. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4860562>
- Ip, C. und Ganther, H. E. (1990): Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention, *Cancer Res* 50 [4], Seite 1206-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2105164>
- Itzkowitz, S. H. und Yio, X. (2004): Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 [1], Seite G7-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194558>
- Jackson, M. I. und Combs, G. F., Jr. (2008): Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11 [6], Seite 718-26. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18827575>
- Jacobs, E. T.; Jiang, R.; Alberts, D. S.; Greenberg, E. R.; Gunter, E. W.; Karagas, M. R.; Lanza, E.; Ratnasinghe, L.; Reid, M. E.; Schatzkin, A.; Smith-Warner, S. A.; Wallace, K. und Martinez, M. E. (2004): Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis, *J Natl Cancer Inst* 96 [22], Seite 1669-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15547179>
- Jiang, C.; Hu, H.; Malewicz, B.; Wang, Z. und Lu, J. (2004): Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells, *Mol Cancer Ther* 3 [7], Seite 877-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15252149>
- Johansson, L.; Gafvelin, G. und Arner, E. S. (2005): Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use, *Biochim Biophys Acta* 1726 [1], Seite 1-13. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967579>
- Karin, M. (2006): Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression, *Nature* 441 [7092], Seite 431-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724054>
- Kim, H.; Kang, H. J.; You, K. T.; Kim, S. H.; Lee, K. Y.; Kim, T. I.; Kim, C.; Song, S. Y.; Kim, H. J. und Lee, C. (2006): Suppression of human selenium-binding protein 1 is a late event in colorectal carcinogenesis and is associated with poor survival, *Proteomics* 6 [11], Seite 3466-3476. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16645984>

- Kim, J.; Modlin, R. L.; Moy, R. L.; Dubinett, S. M.; McHugh, T.; Nickoloff, B. J. und Uyemura, K. (1995): IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response, *J Immunol* 155 [4], Seite 2240-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636270>
- Kipp, A.; Banning, A. und Brigelius-Flohe, R. (2007): Activation of the glutathione peroxidase 2 (GPx2) promoter by beta-catenin, *Biol Chem* 388 [10], Seite 1027-33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17937616>
- Kipp, A.; Banning, A.; van Schothorst, E. M.; Meplan, C.; Schomburg, L.; Evelo, C.; Coort, S.; Gaj, S.; Keijer, J.; Hesketh, J. und Brigelius-Flohe, R. (2009): Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon, *Mol Nutr Food Res* 53 [12], Seite 1561-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810021>
- Kitamura, Y. und Hirota, S. (2004): Kit as a human oncogenic tyrosine kinase, *Cellular and Molecular Life Sciences* 61 [23], Seite 2924-2931. URL: <Go to ISI>://000225528700004
- Knoefel, B.; Nuske, K.; Steiner, T.; Junker, K.; Kosmehl, H.; Rebstock, K.; Reinhold, D. und Junker, U. (1997): Renal cell carcinomas produce IL-6, IL-10, IL-11, and TGF-beta 1 in primary cultures and modulate T lymphocyte blast transformation, *J Interferon Cytokine Res* 17 [2], Seite 95-102. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058315>
- Knupfer, H. und Preiss, R. (2010): Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results, *Int J Colorectal Dis* 25 [2], Seite 135-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898853>
- Kopsell, Dean A. und Randle, William M. (1999): Selenium accumulation in a rapid-cycling Brassica oleracea population responds to increasing sodium selenate concentrations, *Journal of Plant Nutrition* 22 [6], Seite 927-937. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01904169909365683>
- Kryukov, G. V.; Castellano, S.; Novoselov, S. V.; Lobanov, A. V.; Zehtab, O.; Guigo, R. und Gladyshev, V. N. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes, *Science* 300 [5624], Seite 1439-43. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775843>
- Labayle, D.; Fischer, D.; Vielh, P.; Drouhin, F.; Pariente, A.; Bories, C.; Duhamel, O.; Trouset, M. und Attali, P. (1991): Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis, *Gastroenterology* 101 [3], Seite 635-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1650315>
- Lanfear, J.; Fleming, J.; Walker, M. und Harrison, P. (1993): Different Patterns of Regulation of the Genes Encoding the Closely Related 56-Kda Selenium-Binding and Acetaminophen-Binding Proteins in Normal-Tissues and during Carcinogenesis, *Carcinogenesis* 14 [3], Seite 335-340. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453708>
- Larsen, P. R.; Buettner, C. und Harney, J. W. (2000): The role of selenocysteine 133 in catalysis by the human type 2 iodothyronine deiodinase, *Endocrinology* 141 [12], Seite 4606-4612. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11108274>
- Leder, L. D. (1970): [Acute myelo-monocytic leukemia with atypical naphthol-AS-D-chloracetate esterase positive eosinophils], *Acta Haematol* 44 [1], Seite 52-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4320260>
- Leinfelder, W.; Zehelein, E.; Mandrand-Berthelot, M. A. und Bock, A. (1988): Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine, *Nature* 331 [6158], Seite 723-5. URL: <http://www.nature.com/nature/journal/v331/n6158/pdf/331723a0.pdf>
- Letavayova, L.; Vlasakova, D.; Spallholz, J. E.; Brozmanova, J. und Chovanec, M. (2008): Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat Res* 638 [1-2], Seite 1-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900630>
- Levy, D. B.; Smith, K. J.; Beazer-Barclay, Y.; Hamilton, S. R.; Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1994): Inactivation of Both Apc Alleles in Human and Mouse Tumors, *Cancer Research* 54 [22], Seite 5953-5958. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954428>

- Liu, Z.; Gao, S.; Zhao, Y.; Li, P.; Liu, J.; Tan, K. und Xie, F. (2012): Disruption of tumor neovasculature by microbubble enhanced ultrasound: a potential new physical therapy of anti-angiogenesis, *Ultrasound Med Biol* 38 [2], Seite 253-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178162>
- Lobanov, A. V.; Fomenko, D. E.; Zhang, Y.; Sengupta, A.; Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (2007): Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life, *Genome Biology* 8 [9], Seite R198. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17880704>
- Lobanov, A. V.; Hatfield, D. L. und Gladyshev, V. N. (2009): Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1790 [11], Seite 1424-1428. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477234>
- Lorentz, A. (2011): Corecognition of pathogens: an important trigger for mast cell response?, *Int Arch Allergy Immunol* 154 [3], Seite 183-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861639>
- Lu, J. X.; Jiang, C.; Wang, Z. und Ganther, H. (2001): Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (Anoikis) of DU-145 prostate cancer cells, *Cancer Research* 61 [7], Seite 3062-3070. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/7/3062.full.pdf>
- Lupton, J. R.; Sanders, L. M.; Henderson, C. E.; Hong, M. Y.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Carroll, R. J.; Turner, N. D. und Chapkin, R. S. (2004): Pro-oxidant environment of the colon compared to the small intestine may contribute to greater cancer susceptibility, *Cancer Letters* 208 [2], Seite 155-161. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142673>
- MacDonald, B. T.; Tamai, K. und He, X. (2009): Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Dev Cell* 17 [1], Seite 9-26. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619488>
- Maeda, H. und Akaike, T. (1998): Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer, *Biochemistry (Mosc)* 63 [7], Seite 854-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721338>
- Maiorino, M.; Aumann, K. D.; Brigelius-Flohe, R.; Doria, D.; van den Heuvel, J.; McCarthy, J.; Roveri, A.; Ursini, F. und Flohe, L. (1998): Probing the presumed catalytic triad of a selenium-containing peroxidase by mutational analysis, *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft* 37, Seite 118-121. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8962674>
- Makela, A. L.; Nanto, V.; Makela, P. und Wang, W. (1993): The effect of nationwide selenium enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in south western Finland, *Biological Trace Element Research* 36 [2], Seite 151-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7681307>
- Mark, S. D.; Qiao, Y. L.; Dawsey, S. M.; Wu, Y. P.; Katki, H.; Gunter, E. W.; Fraumeni, J. F., Jr.; Blot, W. J.; Dong, Z. W. und Taylor, P. R. (2000): Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers, *J Natl Cancer Inst* 92 [21], Seite 1753-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058618>
- McConnell, K. P. und Roth, D. M. (1966): Respiratory excretion of selenium, *Proc Soc Exp Biol Med* 123 [3], Seite 919-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5959039>
- Meplan, C.; Crosley, L. K.; Nicol, F.; Beckett, G. J.; Howie, A. F.; Hill, K. E.; Horgan, G.; Mathers, J. C.; Arthur, J. R. und Hesketh, J. E. (2007): Genetic polymorphisms in the human selenoprotein P gene determine the response of selenoprotein markers to selenium supplementation in a gender-specific manner (the SELGEN study), *FASEB J* 21 [12], Seite 3063-74. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17536041>
- Meyer, H. A.; Endermann, T.; Stephan, C.; Jung, K. und Schomburg, L. (2011): Selenoprotein P als Tumormarker bei urogenitalen Tumoren, *Urologe* 50, Seite 88 (Abstract P1.2).
- Meyer, H. A.; Hollenbach, B.; Stephan, C.; Endermann, T.; Morgenthaler, N. G.; Cammann, H.; Kohrle, J.; Jung, K. und Schomburg, L. (2009): Reduced serum selenoprotein P concentrations in German prostate cancer patients, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 [9], Seite 2386-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19690186>
- Michaelis, M. (2008): Einfluss von Selenoprotein P auf die intestinale Tumorigenese im Mausmodell, Dissertation, Institut für Biologie, Humboldt Universität zu Berlin. URL: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/michaelis-marten-2008-07-25/PDF/michaelis.pdf>

- Michalaki, V.; Syrigos, K.; Charles, P. und Waxman, J. (2004): Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer, *Br J Cancer* 90 [12], Seite 2312-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15150588>  
<http://www.nature.com/bjc/journal/v90/n12/pdf/6601814a.pdf>
- Mills, G. C. (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown, *J Biol Chem* 229 [1], Seite 189-97. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13491573>
- Molin, D.; Edstrom, A.; Glimelius, I.; Glimelius, B.; Nilsson, G.; Sundstrom, C. und Enblad, G. (2002): Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma, *Br J Haematol* 119 [1], Seite 122-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358914>
- Moreno-Reyes, R.; Suetens, C.; Mathieu, F.; Begaux, F.; Zhu, D.; Rivera, M. T.; Boelaert, M.; Neve, J.; Perlmutter, N. und Vanderpas, J. (1998): Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status, *New England Journal of Medicine* 339 [16], Seite 1112-1120.
- Mork, H.; Lex, B.; Scheurlen, M.; Dreher, I.; Schutze, N.; Kohrle, J. und Jakob, F. (1998): Expression pattern of gastrointestinal selenoproteins--targets for selenium supplementation, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 32 [2], Seite 64-70. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9919613>
- Moser, A. R.; Pitot, H. C. und Dove, W. F. (1990): A Dominant Mutation That Predisposes to Multiple Intestinal Neoplasia in the Mouse, *Science* 247 [4940], Seite 322-324. URL: <http://www.sciencemag.org/content/247/4940/322.full.pdf>
- Mostert, V.; Wolff, S.; Dreher, I.; Kohrle, J. und Abel, J. (2001): Identification of an element within the promoter of human selenoprotein P responsive to transforming growth factor-beta, *European Journal of Biochemistry* 268 [23], Seite 6176-6181. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733012>
- Motsenbocker, M. A. und Tappel, A. L. (1982): A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma, *Biochim Biophys Acta* 719 [1], Seite 147-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6216918>
- Nakashima, J.; Tachibana, M.; Horiguchi, Y.; Oya, M.; Ohigashi, T.; Asakura, H. und Murai, M. (2000): Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer, *Clinical Cancer Research* 6 [7], Seite 2702-2706. URL: <Go to ISI>://000088147500016
- Nelson, Arthur A.; Fitzhugh, O. Garth und Calvery, Herbert O. (1943): Liver Tumors Following Cirrhosis Caused by Selenium in Rats, *Cancer Research* 3 [4], Seite 230-236. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/3/4/230.short>
- Nielsen, H. J.; Hansen, U.; Christensen, I. J.; Reimert, C. M.; Brunner, N. und Moesgaard, F. (1999): Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue, *J Pathol* 189 [4], Seite 487-95. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629548>
- Oberley, T. D. und Zhong, W. X. (2001): Redox-mediated effects of selenium on apoptosis and cell cycle in the LNCaP human prostate cancer cell line, *Cancer Research* 61 [19], Seite 7071-7078. URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/61/19/7071.full.pdf>
- Oldfield, J. E. (1987): The two faces of selenium, *J Nutr* 117 [12], Seite 2002-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3320287>
- Olson, G. E.; Winfrey, V. P.; Hill, K. E. und Burk, R. F. (2008): Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells, *J Biol Chem* 283 [11], Seite 6854-60. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174160>
- Olson, G. E.; Winfrey, V. P.; NagDas, S. K.; Hill, K. E. und Burk, R. F. (2005): Selenoprotein P is required for mouse sperm development, *Biology of Reproduction* 73 [1], Seite 201-211. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15744015>
- Olson, G. E.; Winfrey, V. P.; Nagdas, S. K.; Hill, K. E. und Burk, R. F. (2007): Apolipoprotein E receptor-2 (ApoER2) mediates selenium uptake from selenoprotein P by the mouse testis, *J Biol Chem* 282 [16], Seite 12290-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314095>

- Ordemann, J.; Jacobi, C. A.; Braumann, C.; Schwenk, W.; Volk, H. D. und Muller, J. M. (2002): Immunomodulatory changes in patients with colorectal cancer, *Int J Colorectal Dis* 17 [1], Seite 37-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12018452>
- Papp, L. V.; Lu, J.; Holmgren, A. und Khanna, K. K. (2007): From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity, and their role in human health, *Antioxidants & Redox Signaling* 9 [7], Seite 775-806. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508906>
- Park, C. M.; Reid, P. E.; Walker, D. C. und MacPherson, B. R. (1987): A simple, practical 'swiss roll' method of preparing tissues for paraffin or methacrylate embedding, *J Microsc* 145 [Pt 1], Seite 115-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2437310>
- Park, J. Y.; Seong, J. K. und Paik, Y. K. (2004): Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice, *Proteomics* 4 [2], Seite 514-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14760724>
- Parnham, M. J.; Winkelmann, J. und Leyck, S. (1983): Macrophage, lymphocyte and chronic inflammatory responses in selenium deficient rodents. Association with decreased glutathione peroxidase activity, *Int J Immunopharmacol* 5 [5], Seite 455-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6654541>
- Patterson, E. L.; Milstrey, R. und Stokstad, E. L. (1957): Effect of selenium in preventing exudative diathesis in chicks, *Proc Soc Exp Biol Med* 95 [4], Seite 617-20. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13465747>
- Peters, U.; Chatterjee, N.; Hayes, R. B.; Schoen, R. E.; Wang, Y.; Chanock, S. J. und Foster, C. B. (2008): Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 [5], Seite 1144-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18483336>
- Peters, U.; Chatterjee, N.; Hayes, R. B.; Schoen, R. E.; Wang, Y. H.; Chanock, S. J. und Foster, C. B. (2008): Variation in the selenoenzyme genes and risk of advanced distal colorectal adenoma, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 17 [5], Seite 1144-1154. URL: <http://cebp.aacrjournals.org/content/17/5/1144.full.pdf>
- Peters, U. und Takata, Y. (2008): Selenium and the prevention of prostate and colorectal cancer, *Mol Nutr Food Res* 52 [11], Seite 1261-72. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18763256>
- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res* 30 [9], Seite e36. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972351>
- Pollard, J. W. (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, *Nat Rev Cancer* 4 [1], Seite 71-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708027>
- Polo, Marco; Marsden, William; Komroff, Manuel und Dwiggin, W. A. (1933): The travels of Marco Polo; the Marsden translation, The printing house of Leo Hart, Rochester,.
- Porat, A.; Sagiv, Y. und Elazar, Z. (2000): A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport, *J Biol Chem* 275 [19], Seite 14457-65. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799528>
- Prabhu, K. S.; Zamamiri-Davis, F.; Stewart, J. B.; Thompson, J. T.; Sordillo, L. M. und Reddy, C. C. (2002): Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation, *Biochem J* 366 [Pt 1], Seite 203-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006087>
- Prescott, S. M. und Fitzpatrick, F. A. (2000): Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis, *Biochim Biophys Acta* 1470 [2], Seite M69-78. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10722929>
- Qi, Y.; Schoene, N. W.; Lartey, F. M. und Cheng, W. H. (2010): Selenium compounds activate ATM-dependent DNA damage response via the mismatch repair protein hMLH1 in colorectal cancer cells, *J Biol Chem* 285 [43], Seite 33010-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709753>
- Rao, C. V.; Cooma, I.; Rodriguez, J. G.; Simi, B.; El-Bayoumy, K. und Reddy, B. S. (2000): Chemoprevention of familial adenomatous polyposis development in the APC(min) mouse model by 1,4-phenylene bis(methylene)selenocyanate, *Carcinogenesis* 21 [4], Seite 617-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753194>



- Rao, C. V.; Wang, C. Q.; Simi, B.; Rodriguez, J. G.; Cooma, I.; El-Bayoumy, K. und Reddy, B. S. (2001): Chemoprevention of colon cancer by a glutathione conjugate of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, a novel organoselenium compound with low toxicity, *Cancer Res* 61 [9], Seite 3647-52. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325834>
- Rayman, M. P. (2000): The importance of selenium to human health, *Lancet* 356 [9225], Seite 233-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963212>
- Rayman, M. P. (2005): Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action, *Proc Nutr Soc* 64 [4], Seite 527-42. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313696>
- Rea, H. M.; Thomson, C. D.; Campbell, D. R. und Robinson, M. F. (1979): Relation between Erythrocyte Selenium Concentrations and Glutathione-Peroxidase (Ec-1.11.1.9) Activities of New-Zealand Residents and Visitors to New-Zealand, *British Journal of Nutrition* 42 [2], Seite 201-208. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/113028>
- Reeves, M. und Hoffmann, P. (2009): The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 [15], Seite 2457-2478. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0032-4>
- Reid, M. E.; Duffield-Lillico, A. J.; Slate, E.; Natarajan, N.; Turnbull, B.; Jacobs, E.; Combs, G. F., Jr.; Alberts, D. S.; Clark, L. C. und Marshall, J. R. (2008): The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment, *Nutrition and Cancer-an International Journal* 60 [2], Seite 155-63. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444146>
- Reilly, C. (1998): Selenium: A new entrant into the functional food arena, *Trends in Food Science & Technology* 9 [3], Seite 114-118.
- Renko, K.; Werner, M.; Renner-Muller, I.; Cooper, T. G.; Yeung, C. H.; Hollenbach, B.; Scharpf, M.; Kohrle, J.; Schomburg, L. und Schweizer, U. (2008): Hepatic selenoprotein P (SePP) expression restores selenium transport and prevents infertility and motor-incoordination in Sepp-knockout mice, *Biochem J* 409 [3], Seite 741-9. URL: <http://www.biochemj.org/bj/409/0741/4090741.pdf>
- Ribatti, D.; Crivellato, E.; Roccaro, A. M.; Ria, R. und Vacca, A. (2004): Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression, *Clin Exp Allergy* 34 [11], Seite 1660-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544587>
- Ribatti, D.; Vacca, A.; Nico, B.; Crivellato, E.; Roncali, L. und Dammacco, F. (2001): The role of mast cells in tumour angiogenesis, *Br J Haematol* 115 [3], Seite 514-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11736931>
- Riese, C.; Michaelis, M.; Mentrup, B.; Gotz, F.; Kohrle, J.; Schweizer, U. und Schomburg, L. (2006): Selenium-dependent pre- and posttranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues, *Endocrinology* 147 [12], Seite 5883-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959840>
- Ripple, M. O.; Henry, W. F.; Rago, R. P. und Wilding, G. (1997): Prooxidant-antioxidant shift induced by androgen treatment of human prostate carcinoma cells, *J Natl Cancer Inst* 89 [1], Seite 40-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978405>
- Robinson, M. F. (1989): Selenium in human nutrition in New Zealand, *Nutrition Reviews* 47 [4], Seite 99-107. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660024>
- Rocher, C.; Lalanne, J. L. und Chaudiere, J. (1992): Purification and Properties of a Recombinant Sulfur Analog of Murine Selenium-Glutathione Peroxidase, *European Journal of Biochemistry* 205 [3], Seite 955-960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577013>
- Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G. und Hoekstra, W. G. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science* 179 [73], Seite 588-90. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4686466>
- Rudolf, E.; Rudolf, K. und Cervinka, M. (2008): Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells, *Cell Biol Toxicol* 24 [2], Seite 123-41. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17610029>

- Rustgi, A. K. (2007): The genetics of hereditary colon cancer, *Genes Dev* 21 [20], Seite 2525-38. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938238>
- Saito, H. (2008): Progress in allergy signal research on mast cells: systemic approach to mast cell biology in allergic diseases, *J Pharmacol Sci* 106 [3], Seite 341-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18360090>
- Saito, Y. und Takahashi, K. (2002): Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein, *Eur J Biochem* 269 [22], Seite 5746-51. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423375>
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2001): Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 9780879695774. URL: <http://books.google.com/books?id=9mO2Fx0CuEYC>
- Sato, T.; Terai, M.; Tamura, Y.; Alexeev, V.; Mastrangelo, M. J. und Selvan, S. R. (2011): Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy, *Immunol Res* 51 [2-3], Seite 170-82. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139852>
- Schatzkin, A.; Lanza, E.; Corle, D.; Lance, P.; Iber, F.; Caan, B.; Shike, M.; Weissfeld, J.; Burt, R.; Cooper, M. R.; Kikendall, J. W. und Cahill, J. (2000): Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group, *N Engl J Med* 342 [16], Seite 1149-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770979>
- Schomburg, L. und Schweizer, U. (2009): Hierarchical regulation of selenoprotein expression and sex-specific effects of selenium, *Biochim Biophys Acta* 1790 [11], Seite 1453-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328222>
- Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohe, L.; Sendtner, M. und Kohrle, J. (2003): Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues, *Biochem J* 370 [Pt 2], Seite 397-402. URL: <http://www.biochemj.org/bj/370/0397/3700397.pdf>
- Schwarz, Klaus (1951): A Hitherto Unrecognized Factor Against Dietary Necrotic Liver Degeneration in American Yeast (Factor 3), *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 78 [3], Seite 852-856. URL: <http://ebm.rsmjournals.com/cgi/content/abstract/78/3/852>
- Schwarz, Klaus und Foltz, Calvin M. (1957): Selenium as an Integral Part of Factor 3 against Dietary necrotic liver degeneration, *Journal of the American Chemical Society* 79 [12], Seite 3292-3293. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/ja01569a087>
- Schweizer, U.; Dehina, N. und Schomburg, L. (2011): Disorders of selenium metabolism and selenoprotein function, *Curr Opin Pediatr* 23 [4], Seite 429-35. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670677>
- Schweizer, U.; Schomburg, L. und Savaskan, N. E. (2004): The neurobiology of selenium: lessons from transgenic mice, *J Nutr* 134 [4], Seite 707-10. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051814>
- Schweizer, U.; Streckfuss, F.; Pelt, P.; Carlson, B. A.; Hatfield, D. L.; Kohrle, J. und Schomburg, L. (2005): Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply, *Biochem J* 386 [Pt 2], Seite 221-6. URL: <http://www.biochemj.org/bj/386/0221/3860221.pdf>
- Seo, Y. R.; Kelley, M. R. und Smith, M. L. (2002): Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [22], Seite 14548-53. URL: <http://www.pnas.org/content/99/22/14548.full.pdf>
- Shamberger, R. J. und Frost, D. V. (1969): Possible protective effect of selenium against human cancer, *Can Med Assoc J* 100 [14], Seite 682. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5776446>
- Shao, S. und Zheng, B. (2008): The biogeochemistry of selenium in Sunan grassland, Gansu, Northwest China, casts doubt on the belief that Marco Polo reported selenosis for the first time in history, *Environ Geochem Health* 30 [4], Seite 307-14. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351293>
- Squadrito, M. L. und De Palma, M. (2011): Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy, *Mol Aspects Med* 32 [2], Seite 123-45. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565215>
- Stadtman, T. C.; Bar-Noy, S. und Gorlatov, S. N. (2001): Overexpression of wild type and SeCys/Cys mutant of human thioredoxin reductase in E-coli: The role of selenocysteine in the catalytic activity, *Free Radical Biology and Medicine* 30 [1], Seite 51-61. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134895>

- Stammer, K.; Edassery, S. L.; Barua, A.; Bitterman, P.; Bahr, J. M.; Hales, D. B. und Luborsky, J. L. (2008): Selenium-Binding Protein 1 expression in ovaries and ovarian tumors in the laying hen, a spontaneous model of human ovarian cancer, *Gynecol Oncol* 109 [1], Seite 115-21. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272210>
- Steinbrecher, A.; Meplan, C.; Hesketh, J.; Schomburg, L.; Endermann, T.; Jansen, E.; Akesson, B.; Rohrmann, S. und Linseisen, J. (2010): Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20852007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20852007)
- Steinbrecher, A.; Meplan, C.; Hesketh, J.; Schomburg, L.; Endermann, T.; Jansen, E.; Akesson, B.; Rohrmann, S. und Linseisen, J. (2010): Effects of selenium status and polymorphisms in selenoprotein genes on prostate cancer risk in a prospective study of European men, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19 [11], Seite 2958-68. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852007>
- Stewart, R. D.; Griffiths, N. M.; Thomson, C. D. und Robinson, M. F. (1978): Quantitative selenium metabolism in normal New Zealand women, *Br J Nutr* 40 [1], Seite 45-54. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/667006>
- Storch, J. und Thumser, A. E. A. (2000): The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486 [1], Seite 28-44. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856711>
- Stosnach, H.; Höflich, J.; Behrends, T. und Schomburg, L. (2008): Mit der TRFA den Spurenelementen auf der Spur *BIOspektrum* 6, Seite 626-627. URL: [http://www.biospektrum.de/blatt/d\\_bs\\_download&\\_id=968908](http://www.biospektrum.de/blatt/d_bs_download&_id=968908)
- Sun, J.; Sun, Q. und Lu, S. (2011): From selenoprotein to endochondral ossification: a novel mechanism with microRNAs potential in bone related diseases?, *Med Hypotheses* 77 [5], Seite 807-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856085>
- Sutherland, A.; Kim, D. H.; Relton, C.; Ahn, Y. O. und Hesketh, J. (2010): Polymorphisms in the selenoprotein S and 15-kDa selenoprotein genes are associated with altered susceptibility to colorectal cancer, *Genes Nutr* 5 [3], Seite 215-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052528>
- Takahashi, K.; Saito, Y.; Hayashi, T.; Tanaka, A.; Watanabe, Y.; Suzuki, M. und Saito, E. (1999): Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase - Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P, *Journal of Biological Chemistry* 274 [5], Seite 2866-2871. URL: <http://www.jbc.org/content/274/5/2866.short>
- Tamura, T. und Stadtman, T. C. (1996): A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [3], Seite 1006-11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577704>
- Thomson, C. D. (1998): Selenium speciation in human body fluids, *Analyst* 123 [5], Seite 827-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709477>
- Ufer, C.; Wang, C. C.; Fahling, M.; Schiebel, H.; Thiele, B. J.; Billett, E. E.; Kuhn, H. und Borchert, A. (2008): Translational regulation of glutathione peroxidase 4 expression through guanine-rich sequence-binding factor 1 is essential for embryonic brain development, *Genes Dev* 22 [13], Seite 1838-50. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593884>
- Ursini, F. und Bindoli, A. (1987): The Role of Selenium Peroxidases in the Protection against Oxidative Damage of Membranes, *Chemistry and Physics of Lipids* 44 [2-4], Seite 255-276. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3311419>
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K. D.; Roveri, A.; Schomburg, D. und Flohe, L. (1995): Diversity of glutathione peroxidases, *Methods Enzymol* 252, Seite 38-53. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476373>
- Vernie, L. N. (1984): Selenium in carcinogenesis, *Biochim Biophys Acta* 738 [4], Seite 203-17. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6440591>
- Virchow, R. (1865): Die krankhaften Geschwülste: 30 Vorlesungen, geh. während d. Wintersemesters 1862 - 1863 an d. Univ. zu Berlin, Hirschwald. URL: [http://books.google.de/books?id=FdM\\_AAAACAAJ](http://books.google.de/books?id=FdM_AAAACAAJ)

- Vunta, H.; Davis, F.; Palempalli, U. D.; Bhat, D.; Arner, R. J.; Thompson, J. T.; Peterson, D. G.; Reddy, C. C. und Prabhu, K. S. (2007): The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages, *J Biol Chem* 282 [25], Seite 17964-73. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439952>
- Waddell, W. R. und Loughry, R. W. (1983): Sulindac for polyposis of the colon, *J Surg Oncol* 24 [1], Seite 83-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6887943>
- Waters, D. J.; Chiang, E. C.; Cooley, D. M. und Morris, J. S. (2004): Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women, *Mutat Res* 551 [1-2], Seite 91-107. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225584>
- Wei, W. Q.; Abnet, C. C.; Qiao, Y. L.; Dawsey, S. M.; Dong, Z. W.; Sun, X. D.; Fan, J. H.; Gunter, E. W.; Taylor, P. R. und Mark, S. D. (2004): Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death, *Am J Clin Nutr* 79 [1], Seite 80-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14684401>
- Weingarten, M. A.; Zalmanovici, A. und Yaphe, J. (2005): Dietary calcium supplementation for preventing colorectal cancer and adenomatous polyps, *Cochrane Database Syst Rev* [3], Seite CD003548. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16034903>
- Weller, K.; Foitzik, K.; Paus, R.; Syska, W. und Maurer, M. (2006): Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice, *Faseb Journal* 20 [13], Seite 2366-+. URL: <Go to ISI>://000241702600022
- Welsh, T. J.; Green, R. H.; Richardson, D.; Waller, D. A.; O'Byrne, K. J. und Bradding, P. (2005): Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol* 23 [35], Seite 8959-67. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219934>
- Whanger, P. D.; Pedersen, N. D.; Hatfield, J. und Weswig, P. H. (1976): Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats, *Proc Soc Exp Biol Med* 153 [2], Seite 295-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/995962>
- Whanger, P.; Xia, V. und Thomson, C. (1993): Metabolism of Different Forms of Selenium in Humans, *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease* 7 [2], Seite 121-121.
- WHO (2011): Cancer, Fact Sheet 297. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Wilson, D. S. und Tappel, A. L. (1993): Binding of plasma selenoprotein P to cell membranes, *J Inorg Biochem* 51 [4], Seite 707-14. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245953>
- Wingler, K.; Bocher, M.; Flohe, L.; Kollmus, H. und Brigelius-Flohe, R. (1999): mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins, *Eur J Biochem* 259 [1-2], Seite 149-57. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9914487>
- Wise, G. J.; Marella, V. K.; Talluri, G. und Shirazian, D. (2000): Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer, *Journal of Urology* 164 [3], Seite 722-725. URL: <Go to ISI>://000088682100029
- Wolffram, S.; Arduser, F. und Scharrer, E. (1985): In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats, *J Nutr* 115 [4], Seite 454-9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981263>
- Wu, M.; Kang, M. M.; Schoene, N. W. und Cheng, W. H. (2010): Selenium compounds activate early barriers of tumorigenesis, *J Biol Chem* 285 [16], Seite 12055-62. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20157118>
- Xie, J.K.; Yang, G. und Ge, K. (1964): Views on the etiology of Keshan disease and suggestions for future studies in *Selected Works on Keshan Disease* 1, Seite 1-10.
- Xu, X. M.; Carlson, B. A.; Irons, R.; Mix, H.; Zhong, N. X.; Gladyshev, V. N. und Hatfield, D. L. (2007): Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis, *Biochemical Journal* 404, Seite 115-120. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346238>
- Xu, X. M.; Mix, H.; Carlson, B. A.; Grabowski, P. J.; Gladyshev, V. N.; Berry, M. J. und Hatfield, D. L. (2005): Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the

- selenoprotein synthesis machinery, J Biol Chem 280 [50], Seite 41568-75. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16230358>
- Xu, X. M.; Turanov, A. A.; Carlson, B. A.; Yoo, M. H.; Everley, R. A.; Nandakumar, R.; Sorokina, I.; Gygi, S. P.; Gladyshev, V. N. und Hatfield, D. L. (2010): Targeted insertion of cysteine by decoding UGA codons with mammalian selenocysteine machinery, Proc Natl Acad Sci U S A 107 [50], Seite 21430-4. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115847>
- Yang, G. Q.; Chen, J. S.; Wen, Z. M.; Ge, K. Y.; Zhu, L. Z.; Chen, X. C. und Chen, X. S. (1984): The role of selenium in Keshan disease, Adv Nutr Res 6, Seite 203-31. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6507187>
- Yang, J. G.; Morrisonplummer, J. und Burk, R. F. (1987): Purification and Quantitation of a Rat Plasma Selenoprotein Distinct from Glutathione-Peroxidase Using Monoclonal-Antibodies, Journal of Biological Chemistry 262 [27], Seite 13372-13375. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3654615>
- Yang, M. und Sytkowski, A. J. (1998): Differential expression and androgen regulation of the human selenium-binding protein gene hSP56 in prostate cancer cells, Cancer Res 58 [14], Seite 3150-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679983>
- Yoon, S. O.; Kim, M. M. und Chung, A. S. (2001): Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells, J Biol Chem 276 [23], Seite 20085-92. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274215>
- Yoshida, N.; Ikemoto, S.; Narita, K.; Sugimura, K.; Wada, S.; Yasumoto, R.; Kishimoto, T. und Nakatani, T. (2002): Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma, Br J Cancer 86 [9], Seite 1396-400. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986770>
- Zhang, W.; Stoica, G.; Tasca, S. I.; Kelly, K. A. und Meiningner, C. J. (2000): Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor, Cancer Research 60 [23], Seite 6757-6762. URL: <Go to ISI>://000165638700033
- Zhuo, H.; Smith, A. H. und Steinmaus, C. (2004): Selenium and lung cancer: a quantitative analysis of heterogeneity in the current epidemiological literature, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13 [5], Seite 771-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159309>
- Zinoni, F.; Birkmann, A.; Leinfelder, W. und Bock, A. (1987): Cotranslational Insertion of Selenocysteine into Formate Dehydrogenase from Escherichia-Coli Directed by a Uga Codon, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84 [10], Seite 3156-3160. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3033637>

## Danksagung

Für ihre tatkräftige und motivierende Unterstützung auf dem Weg zur Anfertigung dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Lutz Schomburg für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ich möchte mich bei ihm für die Schaffung und Aufrechterhaltung eines angenehmen und herzlichen Arbeitsklimas bedanken. Durch seine Erfahrungen in Kombination mit seiner motivierenden und optimistischen Grundeinstellung ermöglichte er mir meine Arbeit mit Freude zu bewältigen und auch negative Ergebnisse zu nutzen. Insbesondere bedanke ich mich für sein Vertrauen in meine Person, sein offenes Ohr und die wertvollen Ratschläge in jeder Lebenslage. Diese persönlichen Eigenschaften haben mich nachhaltig sehr beeindruckt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle für sein ausgeprägtes persönliches Interesse gerade an der Förderung und Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern und seinen ehrlichen und gewissenhaften Umgang. Durch seine steten Bemühungen und nicht zuletzt auch durch seine Beharrlichkeit ermöglichte er mir die Teilnahme an Tagungen sowie Informations- und Fortbildungsveranstaltungen.

Herrn Prof. Dr. Werner Kloas danke ich für die fachliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit sowie die konstruktiven Gespräche. Durch seinen persönlichen Einsatz ermöglichte er mir bereits während des Studiums die Bearbeitung eines spannenden Diplomarbeitsthemas. Hierdurch entwickelte ich das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten und lernte, wie wichtig es ist an die eigene Arbeit zu glauben.

Ein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle Endokrinologie. Für die technische Unterstützung und ihre stets hilfsbereite Art danke ich Katja Schreiber, Anja Fischbach, Antje Kretschmar, Carola Geiler und vor allem Vartiter Seher für ihre engagierte und stets freudvolle Mitarbeit an allen histologischen Fragestellungen.

Für den freundschaftlichen, hilfsbereiten und produktiven Umgang möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden/innen Antonia Hög, Mette Stödter, Carolin Höfig, Nicole Pietschman, Niels Becker, Doreen Braun, Sandra Seeher, Franziska Wolgemuth und den ehemaligen Doktoranden/innen Dr. Peter Hofmann, Dr. Kostja Renko, Dr. Marten Michaelis und Dr. Eva Wirth bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Tobias Endermann für die tolle

Zusammenarbeit, die passive und aktive gemeinsame sportliche Betätigung und die mitunter nicht nur projektbezogenen schweren Lasten, die er im Zuge meiner doch häufigen Standortwechsel, bereit war zu tragen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen beiden wundervollen Kindern und insbesondere bei Christine für ihr Verständnis, ihre Flexibilität und ihre Unterstützung bedanken. Ohne den Rückhalt und die Kraft, die mir unsere kleine Familie gibt, wäre ich nicht so weit gekommen.

---

## Publikationsliste

### Originalarbeiten:

1. Stosnach H, Hoeflich J, **Behrends T**, Schomburg L (2008) Mit der TRFA den Spurenelementen auf der Spur. BIoSpektrum 06626-627
2. Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M, Hollenbach B, **Behrends T**, Kohrle J, Schweizer U, Schomburg L (2009) Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. FASEB J 23(6):1758-1765
3. Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, Wurtz S, **Behrends T**, Hermelink B, Hofmann F, Jagnytsch O, Kroupova H, Lorenz C, Neumann N, Pietsch C, Trubiroha A, Van Ballegooy C, Wiedemann C, Lutz I (2009) Endocrine disruption in aquatic vertebrates. Ann N Y Acad Sci 1163187-200
4. **Behrends T**, Urbatzka R, Krackow S, Elepfandt A, Kloas W (2010) Mate calling behavior of male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) is suppressed by the antiandrogenic endocrine disrupting compound flutamide. Gen Comp Endocrinol 168(2):269-274
5. Hoeflich J, Hollenbach B, **Behrends T**, Hoeg A, Stosnach H, Schomburg L (2010) The choice of biomarkers determines the selenium status in young German vegans and vegetarians. Br J Nutr 104(11):1601-1604
6. Chiu-Ugalde J, Theilig F, **Behrends T**, Drebes J, Sieland C, Subbarayal P, Kohrle J, Hammes A, Schomburg L, Schweizer U (2010) Mutation of megalin leads to urinary loss of selenoprotein P and selenium deficiency in serum, liver, kidneys and brain. Biochem J 431(1):103-111
7. Mittag J, **Behrends T**, Hoefig CS, Vennstrom B, Schomburg L (2010) Thyroid hormones regulate selenoprotein expression and selenium status in mice. PLoS One 5(9):e12931
8. Mittag J, **Behrends T**, Nordstrom K, Anselmo J, Vennstrom B, Schomburg L (2012) Serum copper as a novel biomarker for resistance to thyroid hormone. Biochem J 443(1):103-109



- 
9. Meyer HA, Endermann T, Stephan C, Stoedter M, **Behrends T**, Wolff I, Jung K, Schomburg L (**2012**) Selenoprotein P Status Correlates to Cancer-Specific Mortality in Renal Cancer Patients. PLoS One 7(10)

**Abstracts:**

1. Elepfandt A, **Behrends T**, Cosar F, Hillig R, Stamm K, Appeltants D (**2007**) Water wave analysis with the lateral line system in the clawed frog *Xenopus*: Multiple simultaneous waves, change of wave speed. Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen
2. **Behrends T**, Gralla O, Hollenbach B, Endermann T, Lippmann S, Schomburg L (**2009**) Trace element analysis in human seminal fluid – interaction of selenium and zinc. TXRF 2009, Götheburg, Schweden
3. **Behrends T**, Mittag J, Höfig C, Venström B, Schomburg L (**2010**) Interaction of thyroid hormones and selenium status in mice. Selenium 2010, Kyoto, Japan
4. Endermann T, **Behrends T**, Gralla O, Hollenbach B, Scharpf M, Schomburg L (**2010**) SelenoproteinP - more than a Se transporter in male fertility. Selenium 2010, Kyoto, Japan
5. Dehina N, Eckstein A, Minich W, **Behrends T**, Morgenthaler NG, Köhrle J, Schomburg L (**2009**) Circulating Selenoprotein P concentrations are decreased in patients with graves' disease and correlate inversely to severity of orbitopathy. 34th Annual Meeting of the European Thyroid Association, Lissabon, Portugal

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Zur Interaktion von Genotyp und Ernährung bei Darmkrebs: Selen- und Selenoprotein P-abhängige Tumorigenese im Apc<sup>min/+</sup>-Mausmodell“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Des Weiteren erkläre ich von der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotions-verordnung Kenntnis genommen zu haben. Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit weder in dieser noch einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Thomas Behrends